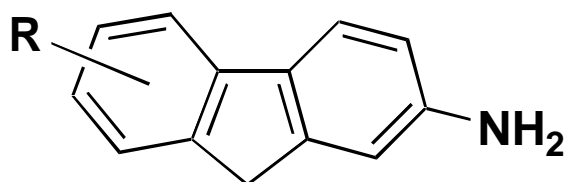
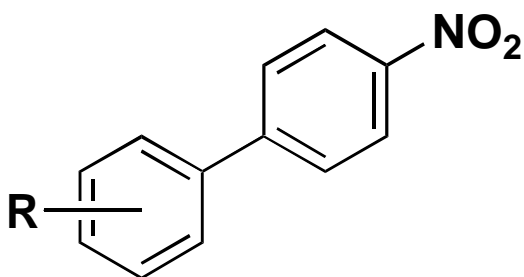

Synthese und Struktur-Mutagenitäts-Untersuchungen von substituierten aromatischen Aminen und Nitroverbindungen

Neue Strategien zur Verringerung der Mutagenität



Markus Klein

Synthese und Struktur-Mutagenitäts-Untersuchungen
von substituierten aromatischen Aminen
und Nitroverbindungen
Neue Strategien zur Verringerung der Mutagenität

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Markus Klein

aus Gronau

Marburg/Lahn 2000

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

- M. Klein, G. Boche (1999) Regiospecific synthesis of substituted nitrofluorenes and amino-fluorenes with the Negishi coupling reaction as key step, *Synthesis* 7, 1246 - 1250.
- M. Klein, U. Voigtmann, T. Haack, L. Erdinger, G. Boche (2000) From mutagenic to non-mutagenic nitroarenes: Effect of bulky alkyl substituents on the mutagenic activity of 4-nitrobiphenyl in *Salmonella thyphimurium*. Part I. Substituents ortho to the nitro group and in 2'-position, *Mut. Res.* 467, 55 - 68.
- M. Klein, L. Erdinger, G. Boche (2000) From mutagenic to non-mutagenic nitroarenes: Effect of bulky alkyl substituents on the mutagenic activity of nitroaromatics in *Salmonella thyphimurium*. Part II. Substituents far away from the nitro group, *Mut. Res.* 467, 69 - 82.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am:

26.06.2000

Erstgutachter:

Prof. Dr. G. Boche

Zweitgutachter:

Prof. Dr. T. Carell

Tag der mündlichen Prüfung:

05.07.2000

Die vorliegende Arbeit wurde am Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Gernot Boche

in der Zeit von Oktober 1997 bis Juni 2000 durchgeführt.

Es ist mir eine Freude all denjenigen zu danken, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Boche für die interessante Themenstellung, seine Unterstützung, seine Ratschläge, seine stete Diskussionsbereitschaft, aber auch für die wissenschaftliche Freiheit, die mir bei der Bearbeitung gewährt wurde.

Danken möchte ich Herrn Erdinger und seinen Mitarbeitern von Hygiene-Institut in Heidelberg für die angenehme Zusammenarbeit bei der Durchführung der Ames-Tests. Der BASF AG danke ich für ihre finanzielle Unterstützung.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich herzlich für das nette Arbeitsklima, die zahlreichen Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft und die guten Kontakte auch über das Fachliche hinaus. Besonders erwähnen möchte ich Sven Kannenberg, Carsten Glende und Markus Bold für ihre Hilfe bei der Durchsicht des Manuskripts.

Den Studenten Björn Stegemann, Marcia Wrackmeyer und Ulrich Kermer danke ich für ihren großen Einsatz bei der Bearbeitung der Vertiefungsprojekte. Mein Dank gilt auch allen Praktikanten, die durch das ein oder andere Präparat Anteil an dieser Arbeit haben.

Den Damen und Herren der analytischen und spektroskopischen Abteilungen am Fachbereich danke ich für die zuverlässige Anfertigung von Analysen und Spektren.

Meinen Eltern und meinen Freunden gilt mein Dank für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Groß sind die Werke des Herrn;
wer sie erforscht,
der hat Freude daran.

Psalm 111, 2

A	Einleitung.....	1
A.1	Chemische Kanzerogenese	1
A.1.1	Historischer Überblick.....	2
A.1.2	Einteilung kanzerogener Substanzen.....	3
A.1.3	Mutationen, Phasen der Krebsentstehung.....	4
A.1.4	Risikofaktoren, Quellen kanzerogener Substanzen.....	6
A.2	'Green Chemistry'	7
A.3	Ziele und Aufbau dieser Arbeit	8
B	Aromatische Amine und Nitroverbindungen.....	10
B.1	Bedeutung, Vorkommen, Toxizität	10
B.2	Aufnahme und metabolische Aktivierung	13
B.3	Adduktbildung	19
B.3.1	Addukte von Amino-/Nitrobiphenyl, -fluoren und -stilben.....	19
B.3.2	Addukte und mutagenes Potential	22
B.4	Tests für Mutagenität und Kanzerogenität	24
C	Der Mutagenitätstest nach Ames.....	26
C.1	Grundlagen	26
C.2	Spezialstämme	28
C.3	Durchführung	29
C.4	Cytotoxische Reaktionen	30
C.5	Bewertung und Vergleichbarkeit der Testergebnisse	31
D	Struktur-Mutagenitäts Beziehungen.....	33
D.1	Überblick	33
D.2	Klassifizierung	34
D.3	Wichtige Strukturfaktoren für die Mutagenität	35
D.4	Wichtige QSAR-Gleichungen	43
D.5	Substituenteneinflüsse	46
D.6	Modellsubstanzen zur Berücksichtigung sterischer Effekte	49
E	Synthese der Modellsubstanzen.....	53
E.1	Forderungen an effiziente Synthesen	53
E.2	4-Nitro-/4-Aminobiphenyle	54
E.2.1	Kreuzkupplungen – Übersicht.....	55
E.2.2	Alkyl/CF ₃ -substituierte Verbindungen und Derivate.....	59
E.2.3	Alkoxy-/Hydroxy-substituierte Verbindungen und Derivate.....	69
E.2.4	N,N-Dialkyl/Amino-substituierte Verbindungen und Derivate.....	77
E.3	2-Nitro-/2-Aminofluorene	81
E.3.1	Darstellung von 2-Alkylfluoren durch Aryl-Alkyl-Kupplung.....	82
E.3.2	2-Methyl-7-nitrofluoren durch Stille-Kupplung	84
E.3.3	Regioselektiver Aufbau des Fluorengerüsts	85
E.3.4	Darstellung der Aminofluorene durch Reduktion.....	90
E.4	Heteroaromatische Verbindungen	91
E.4.1	Darstellung substituierter 2-Aza-4-nitrobiphenyle.....	91

E.4.2	Darstellung substituierter 3-Aza-4-nitrobiphenyle	93
E.4.3	Darstellung substituierter 3-Aza-4-aminobiphenyle	95
E.5	4-Nitro-/4-Aminostilbene	96
F	Ergebnisse und Diskussion der Mutagenitäts-Untersuchungen	98
F.1	Modifikation der funktionellen Gruppe	98
F.1.1	Literaturüberblick	98
F.1.2	Ergebnisse	99
F.1.3	Diskussion	103
F.2	Einfluß von ortho-Alkylsubstituenten	105
F.2.1	Literaturüberblick	105
F.2.2	Diskussion	111
F.3	Einfluß von para-Alkylsubstituenten	114
F.3.1	Literaturüberblick	114
F.3.2	Ergebnisse – Nitroaromaten	115
F.3.3	Ergebnisse – Aminoaromaten	124
F.3.4	Diskussion	131
F.3.5	Analyse von Konformationen	135
F.4	Einfluß von Hydroxyalkyl-, Bromoalkyl- und Carboxylsubstituenten	142
F.4.1	Literaturüberblick	142
F.4.2	Ergebnisse	144
F.4.3	Diskussion	146
F.5	Einfluß von Trifluormethylsubstituenten	148
F.5.1	Ergebnisse und Diskussion	148
F.6	Einfluß von para-Alkylsubstituenten bei Nitrostilbenen	153
F.6.1	Ergebnisse	153
F.6.2	Diskussion	157
F.7	Einfluß von para-Alkoxy-/Hydroxysubstituenten und Derivaten	160
F.7.1	Literaturüberblick	160
F.7.2	Ergebnisse	161
F.7.3	Diskussion	168
F.8	Einfluß von Amino-/N,N-Dialkylaminosubstituenten	170
F.8.1	Literaturüberblick	170
F.8.2	Ergebnisse	171
F.8.3	Diskussion	173
G	QSAR-Analyse	175
G.1	Vergleich von vorhergesagten und experimentellen Mutagenitäten	175
G.1.1	Ortho-alkylierte Verbindungen	176
G.1.2	Para-alkylierte Verbindungen	183
G.1.3	Para-alkylierte Nitrostilbene	191
G.1.4	CF ₃ -substituierte Verbindungen	193
G.2	Anpassung der Debnath-Hansch-Gleichungen	194
H	Zusammenfassung und Ausblick	200
I	Experimenteller Teil	206
I.1	Computermethoden	206
I.1.1	Strukturparameter für QSAR-Rechnungen	206
I.1.2	Macromodel Konformationsanalysen	206

I.2	Synthesen und Experimente	207
I.2.1	Geräte, Chemikalien, Methoden.....	207
I.2.2	4-Nitrobiphenyle und 4-Aminobiphenyle mit Alkyl- und CF ₃ -Substituenten.....	210
I.2.3	4-Nitrobiphenyle und 4-Aminobiphenyle mit Hydroxy-/Alkoxy-substituenten.....	220
I.2.4	4-Nitrobiphenyle und 4-Aminobiphenyle mit Dialkylaminosubstituenten.....	233
I.2.5	Sonstige 4-Nitrobiphenyle und 4-Aminobiphenyle	238
I.2.6	2-Nitrofluorene und 2-Aminofluorene	241
I.2.7	Heteroaromatische Verbindungen.....	250
I.2.8	4-Nitrostilbene.....	257
I.3	Mutagenitätsuntersuchungen	260
J	Literaturverzeichnis	261

Abb.	Abbildung
Ad	Adamantyl
AIBN	Azobis- <i>iso</i> -butyronitril
Arom	Aromatisch
ATP	Adenosintriphosphat
AcCo A	Acetyl-Coenzym A
dba	Dibenzylidenaceton
CYP	Cytochrom P
d	Tage
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DME	Dimethoxyethan
DMF	Dimethylformamid
dppe	1,2-Bis(diphenylphosphino)ethan
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
dppp	1,3-bis(diphenylphosphino)propan
EE	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
h	Stunden
IF	Induktionsfaktor
HMPTA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HMDS	Hexamethyldisilazan
MO	Monooxygenasen
NBS	N-Bromsuccinimid
PAH	Polycyclischer Aromat
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PE	Petrolether (40 - 60 °C)
PPA	Polyphosphorsäure
Py	Pyridin
QSAR	Quantitative structure activity relationship
THF	Tetrahydrofuran
TAV	Typische Arbeitsvorschrift
TBABr ₃	Tetrabutylammoniumtribromid
TPPTS	Trinatrium-3,3',3''-phosphantriylbenzolsulfonsäure
TFP	Tris(2-furyl)phosphin
UDP	Uridindiphosphat

A Einleitung

A.1 Chemische Kanzerogenese

Viele chemische Substanzen bergen in sich ein hohes toxisches Potential für Mensch und Umwelt. Gelangen solche Stoffe in den Körper, indem sie über die Haut, die Atemluft oder mit der Nahrung aufgenommen werden, können sie die normalen Lebensfunktionen auf unterschiedliche Weise beeinträchtigen, unseren Organismus schädigen und Krankheiten auslösen. Eine besonders gefürchtete Erkrankung, die in eindeutigem Zusammenhang mit der Aufnahme von bestimmten Chemikalien steht, ist der Krebs.¹

Krebs – Definition:

Unter Krebs versteht man das Auftreten bösartiger Gewebsneubildungen, die als Tumoren oder Geschwülste bezeichnet werden.² Im Krebsgewebe sind die normalen Mechanismen zur Wachstumsregulation aufgehoben. Es wächst autonom, durchdringt und zerstört dabei das umliegende Gewebe. Durch Metastasierung, der Bildung von Tochtergeschwülsten, kann sich der Krebs zudem auf andere, primär nicht befallene Regionen ausdehnen, so daß eine operative Entfernung aller Tumoren unmöglich wird. Grundsätzlich können nahezu alle Organe von Krebs befallen werden. Ihr Ausfall führt letztlich zum Tod. Die meisten tödlich verlaufenden Krebserkrankungen konzentrieren sich aber auf wenige Organe (siehe Tabelle 1). Dabei werden bei Männern und Frauen, abgesehen von den Tumorerkrankungen der Geschlechtsorgane, durchaus Unterschiede beobachtet.

Tabelle 1: Krebs – Neuerkrankungen und Sterbefälle 1995^a

Organ	Neuerkrankungen (%)		Sterbefälle (%)	
	Mann	Frau	Mann	Frau
Lunge	17.9	4.7	26.7	7.9
Dickdarm/Mastdarm	14.2	16.8	12.4	16.3
Brustdrüse	-	24.9	-	17.9
Prostata	15.5	-	11.0	-
Magen	6.4	5.5	7.3	7.2
Harnblase	7.7	-	3.9	-

^a Quelle: Statistisches Bundesamt Bonn.

Krebserkrankungen waren bereits in der Antike bekannt. Der Begriff *καρχινοσ* (karzinós) wurde beispielsweise von Hippokrates eingeführt. Dennoch sind auch heute – trotz der enor-

men Fortschritte in der Medizin und hochmoderner therapeutischer Methoden – Krebserkrankungen häufig nicht heilbar. Der prozentuale Anteil von krebsbedingten Todesfällen ist in diesem Jahrhundert kontinuierlich gestiegen. So ist Krebs heute in vielen Industrieländern hinter den Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache.ⁱ Allein in der Bundesrepublik starben daran 1998 fast 213.000 Menschen. Das ist fast ein Viertel aller Todesfälle insgesamt.³

A.1.1 Historischer Überblick

Erste Vermutungen darüber, daß Krebs durch den Kontakt mit bestimmten Stoffen ausgelöst werden könnte, schreibt man Paracelsus (1493-1541) zu, der Realgar (As_4S_4) als Ursache für den erhöhten Lungenkrebsanteil unter Bergleuten in Schneeberg und Joachimsthal verantwortlich machte. Seit Mitte des achtzehnten Jahrhunderts hat man entsprechende Beobachtungen systematisch erfaßt. Wichtige Beispiele gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Chemische Kanzerogene (nach Marquardt)¹

Quelle (Kanzerogen)	betroffenes Organ	Autor	Jahr
Schnupftabak (PAH) ^a	Nase	Hill	1761
Ruß (PAH)	Skrotum	Pott	1775
Arsen	Haut	Paris	1822
Kohlenteer (PAH)	Haut	von Volkmann	1875
Aromatische Amine/Farbstoffe	Blase, Harnwege	Rehn	1885
Röntgenstrahlung	Haut	Van Trieben	1902
Pechblende	Haut	Teutschländer	1928
Radium	Knochen	Martland	1929
Zigarrenrauch	Lunge, Blase	Lickint	1930
Asbest	Lunge	Gloyne	1932
Chromate	Atemwege	Pfeil	1935
Buttergelb (Azofarbstoff)	Leber	Kinosita	1936

So beschrieb Hill die gehäufte Bildung von Tumoren der Nasenschleimhaut nach langjährigem Gebrauch von Schnupftabak, Pott erkannte, daß Ruß verstärkt Hautkrebs bei Londoner Schornsteinfegern auslöste und Rehn entdeckte das vermehrte Auftreten von Harnblasenkrebs

ⁱ Die Krebssterblichkeit steigt mit dem Alter stark an. Aufgrund der höheren Lebenserwartung (1900: 45-50; heute 75-80) versterben heute viel mehr Menschen an Krebs als früher.

bei Arbeitern der Farbstoffindustrie. Heute weiß man, daß hierfür vor allem der Kontakt mit polycyclischen aromatischen Aminen verantwortlich war. Mittlerweile wurden noch eine Reihe anderer Fälle aufgedeckt, bei denen ein Zusammenhang zwischen Krebs und der beruflichen Exposition gegenüber bestimmten Stoffen (Arsen, Kohlenteer, Pechblende, Asbest oder Chromate) besteht.¹

Der Anfang des 20. Jahrhunderts markierte den Beginn der experimentellen Krebsforschung. Seit Yamagiwa und Ichikawa 1918 als erste zeigen konnten, daß Teer nach dermalen Exposition bei Kaninchen Tumoren erzeugt, wurden durch Tierexperimente zahlreiche Substanzen natürlichen oder synthetischen Ursprungs mit kanzerogener Wirkung identifiziert.¹ Hervorzuheben sind Arbeiten über polycyclische Kohlenwasserstoffe (Hieger und Cook, 1933), 2-Naphthylamin (Hueper, 1938),⁴ Benzidin (Spitz, 1950)⁵ und über 4-Aminobiphenyl (Walpole, 1954).⁶ Studien zur Bedeutung von Mutationen, zur Tumorpromotion und zur metabolischen Aktivierung (Miller, Miller, 1969)⁷ bilden die Grundlage unseres heutigen Wissens über die chemische Kanzerogenese. Zwar spielen für die Krebsentstehung (Kanzerogenese) auch andere Faktoren wie ionisierende Strahlung, übermäßige Exposition gegenüber Sonnenlicht, Infektionen durch Viren, Bakterien und Parasiten (z.B. Hepatitis B, Papilloma Virus, Nematoden) oder genetische Veranlagungenⁱ eine Rolle, die Aufnahme kanzerogener Chemikalien stellt jedoch die Hauptursache dar. Bezeichnenderweise bilden sich über 90 % aller Tumore in epithelialen Geweben (Haut, Magen-Darm-Trakt, Bronchialsystem, Urogenitalsystem), die in direktem Kontakt mit der Umwelt stehen.

A.1.2 Einteilung kanzerogener Substanzen

Kanzerogene Chemikalien werden in zwei Hauptgruppen unterteilt. Entscheidend ist ihr Verhalten gegenüber der DNA, in deren Basensequenz alle Informationen über den Aufbau, die Funktion, das Wachstum und die Differenzierung der Zelle gespeichert sind. Substanzen der ersten Gruppe nennt man genotoxische Kanzerogene. Sie sind in der Lage, unser Erbgut zu schädigen und so Mutationen auszulösen. Hierzu gehören einerseits die **direkten Kanzerogene**, die aufgrund ihrer Struktur direkt mit der DNA reagieren können, andererseits die **indirekten Kanzerogene**, die erst nach metabolischer Aktivierung im Körper die DNA angreifen können. Einige Beispiele sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

ⁱ z.B. Xeroderma pigmentosum, Defekt der DNA-Reparatur.

Tabelle 3: Genotoxische Substanzen

Klassifizierung	Beispiele
Direkte Kanzerogene	Alkylantien (Alkylhalogenide, α -Halogenalkohole, α -Halogenether, Stickstoff-, Schwefelloste, Aziridine, Epoxide, Sultone, Alkylsulfate) Alkylhydrazine, Reaktive Sauerstoffspezies (Hydroxylradikale) Interkalierende Stoffe (Acridin-Orange, Ethidiumbromid) Metalle/Metallverbindungen (As, Be, Pb, Cd, Cr, Co, Ni, <i>cis</i> -Platin ⁱ)
Indirekte Kanzerogene	Polycyclische Aromaten Aromatische Amine Aromatische Nitroverbindungen Alkene, Aldehyde, halogenierte Kohlenwasserstoffe Nitrosamine Naturstoffe (Aflatoxine, Furane)

Die zweite Gruppe bilden die epigenetischen Kanzerogene, die durch andere biologische Wirkungenⁱⁱ die Entstehung von Krebs fördern und hier nicht weiter besprochen werden sollen.

A.1.3 Mutationen, Phasen der Krebsentstehung

Die chemische Kanzerogenese wird als ein Mehrstufen-Prozeß mit langjähriger Latenzzeit angesehen, der in drei Phasen unterteilt werden kann. Veränderungen des Erbguts durch genotoxische Substanzen können eine normale Zelle in einen "präkanzerösen" Zustand überführen, man bezeichnet diesen Vorgang als **Initiation**. Die molekularen Mechanismen der DNA-Schädigung können dabei sehr unterschiedlich sein. So bilden viele genotoxische Substanzen mit der DNA Addukteⁱⁱⁱ, andere induzieren Strangbrüche oder interkalieren zwischen benachbarte DNA-Basen und verändern dadurch ihren Abstand. Diese Prozesse sind selbst sind keine Mutationen, sie können aber bei der Zellteilung den normalen Ablauf der Replikation stören und so Mutationen im Tochter-DNA-Strang verursachen. Findet hierbei der Austausch

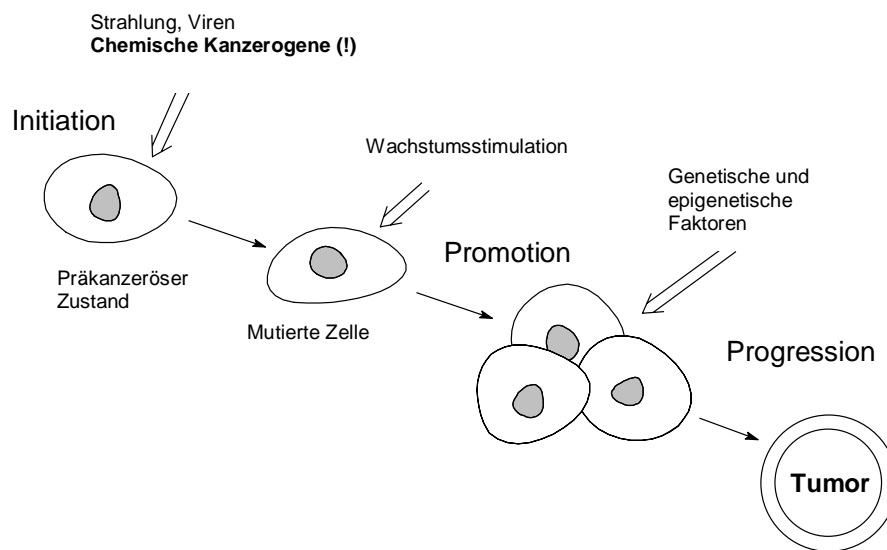
ⁱ *cis*-Dichlorodiaminplatin(II) wird aufgrund dieser Wirkung auch in der Krebstherapie eingesetzt.

ⁱⁱ Zu diesen Wirkungen gehören Cytotoxizität, die gesteigerte Zellproliferation (Zellteilung) auslöst, chronische Entzündungsreaktionen, hormonelle Einflüsse, immunologische Einflüsse und die Tumorpromotion.

ⁱⁱⁱ Der Begriff Addukt suggeriert eine Umsetzung im Sinne einer Lewis Säure-Base-Reaktion. Er entstammt der biochemischen Terminologie und bezeichnet das Reaktionsprodukt aus einem Kanzerogen (Elektrophil) und einer DNA-Base (Nukleophil).

eines Basenpaares gegen ein anderes statt, spricht man von einer Basensubstitution. Eine Rasterschub- oder Frameshift-Mutation entsteht dagegen durch Überspringen oder Einfügen einer Base, beispielsweise dann, wenn der Basenabstand durch Interkalation eines Fremdstoffes verändert wurde. Zusätzlich zu solchen Punktmutationen können auch Chromosomen-Mutationen auftreten, wobei Chromosomenabschnitte aufgenommen, verloren oder ausgetauscht werden. Ob eine Verbindung mutagen wirkt oder nicht, kann heute relativ einfach durch Genotoxizitätsassays, wie den Ames-Test (siehe Kapitel C), ermittelt werden.

Abb. 1: Phasen der Krebsentstehung



Das weitere Schicksal der mutierten Zelle hängt stark von der Art der Mutation ab. Während manche Mutationen die Zellfunktion gar nicht beeinträchtigen (stille Mutationen), und zu viele Mutationen meist das Absterben der Zelle zur Folge haben, scheinen besonders Mutationen in wichtigen Kontrollgenen die Krebsentwicklung zu initiieren (z.B. durch Aktivierung von Onkogenen oder Deaktivierung von Anti-Onkogenen).⁸ So zeigen beispielsweise die Hälfte aller menschlichen Tumoren Mutationen im Tumor-Suppressor Gen p53.⁹

Eine besondere Bedeutung kommt den DNA-Reparatursystemen zu, die normalerweise mit hoher Effizienz Replikationsfehler korrigieren und damit Mutationen verhindern.¹⁰ Diese Systeme können allerdings versagen, z.B. wenn zu viele Fehler gleichzeitig auftreten oder chemische Substanzen, die selbst nicht mutagen sind (Co-Kanzerogene) ihre Wirkung hemmen.

Erst durch den Einfluß bestimmter wachstumsstimulierender Faktoren tritt die Kanzerogenese in die **Promotionsphase** ein, in der sich die initiierte Zelle zu teilen beginnt (selektive, klonale Expansion). Diese Wachstumsstimulation kann durch Chemikalien ausgelöst werden, aber auch durch Entzündungen, körperfremde Feststoffe und durch vermehrten Zelltod. Durch

weitere genetische und epigenetische Faktoren tritt die Kanzerogenese in die dritte Phase, die **Progressionsphase**, ein. Hierbei entwickeln die Zellen Eigenschaften des ungehemmten Wachstums und Metastasierung; man spricht auch von einer malignen Transformation. Weitere Zellvermehrung führt schließlich zur Bildung der Tumoren und damit zu klinisch erkennbarem Krebs¹¹.

A.1.4 Risikofaktoren, Quellen kanzerogener Substanzen

Tagtäglich sind wir krebsauslösenden Substanzen und Einflüssen ganz unterschiedlicher Herkunft ausgesetzt. Die Mehrzahl der chemisch induzierten Krebserkrankungen läßt sich allerdings nach heutigem Erkenntnisstand vor allem auf das Rauchenⁱ und eine unausgewogene Ernährung zurückführen. Bei der Krebsentstehung durch das Rauchen spielen zahlreiche Verbindungen mit kanzerogener Wirkungen (polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine, Benzol, Acetaldehyd, etc.),¹² die mit dem Qualm inhaliert werden, die entscheidende Rolle. Im Hinblick auf die Ernährung werden verschiedene Aspekte diskutiert, die über die Aufnahme kanzerogener Stoffe weit hinaus gehen. So zeigen epidemiologische Studien, daß ein hoher Fett- und Fleischanteil in der Nahrung das Krebsrisiko deutlich erhöht (z.B. in Dickdarm, Brust, Prostata, Pankreas), während ein hoher Anteil von Obst und Gemüse und den darin enthaltenen Antioxidationsmitteln (Carotinoide, Riboflavine, etc.) und Vitaminen das Risiko senkt. Außerdem wurde entdeckt, daß bei der Zubereitung proteinreicher Nahrung (Fleisch und Fisch) viele stark mutagene und kanzerogene Verbindungen gebildet werden. Durch Reaktion von Nitrit (Pökelsalz) mit sekundären Aminen entstehen beispielsweise Nitrosamineⁱⁱ und beim Grillen oder Braten von Fleisch durch Pyrolyse von Aminosäuren heteroaromatische Amine.¹³ Andere Quellen kanzerogener Stoffe in Nahrungsmitteln sind Lebensmittelzusatzstoffe und Aflatoxine, die von Schimmelpilzen produziert werden. Rauchen und falsche Ernährung verursachen nach Schätzungen ca. 70 % aller Krebserkrankungen in den Industrieländern.

Weitere wichtige Risikofaktoren sind chronische Entzündungen z.B. der Lunge, ausgelöst durch eingeatmete Stäube oder Asbestfasern, und oxidative Schädigungen der DNA durch Nebenprodukte (Hydroxylradikale → Strangbrüche) des Metabolismus ("oxidativer Streß"), die besonders im Alter stark zunehmen.ⁱⁱⁱ Auch Hormone und einige Pharmaka (besonders

ⁱ Rauchen löst vor allem Krebs in der Lunge, aber auch in anderen Regionen wie Mund, Rachenhöhle, Bauspeicheldrüse, Niere, Magen, Harnblase aus.

ⁱⁱ z.B. bei der Herstellung von Toast Hawai.

ⁱⁱⁱ Die Bedeutung solcher endogener Schädigungen kann momentan nicht verläßlich eingeschätzt werden. Als preventive Maßnahme wird die Einnahme von Antioxidationsmitteln empfohlen.

Cytostatika) stehen im Verdacht Krebs auszulösen. Die Bedeutung von Umweltschadstoffen bei der Krebsentstehung ist umstritten. Als alleinige Ursache scheinen sie aber nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Natürlich stellt auch die Industrie eine bedeutende Quelle kanzerogener Stoffe dar. Viele chemische Verbindungen, die über Jahrzehnte als unbedenklich galten und in großem Umfang in den Verkehr gebracht wurden, haben sich im Nachhinein als kanzerogen erwiesen (z.B. Asbest, Benzol, Azofarbstoffe auf Benzidinbasis, Buttergelb, Vinylchlorid). Auch etliche Zwischenprodukte, die bei der Produktion verwendet werden, Lösungsmittel und anfallende Abfälle sind genotoxisch und kanzerogen. Der Anteil beruflich bedingter oder auf andere Art durch Industriechemikalien direkt verursachter Krebserkrankungen an der Gesamtanzahl wird auf deutlich unter 10 % geschätzt. Das Risiko für Angestellte der chemischen Industrie und verwandter Zweige, die mit solchen Stoffen umgehen, ist aber besonders hoch.

A.2 'Green Chemistry'

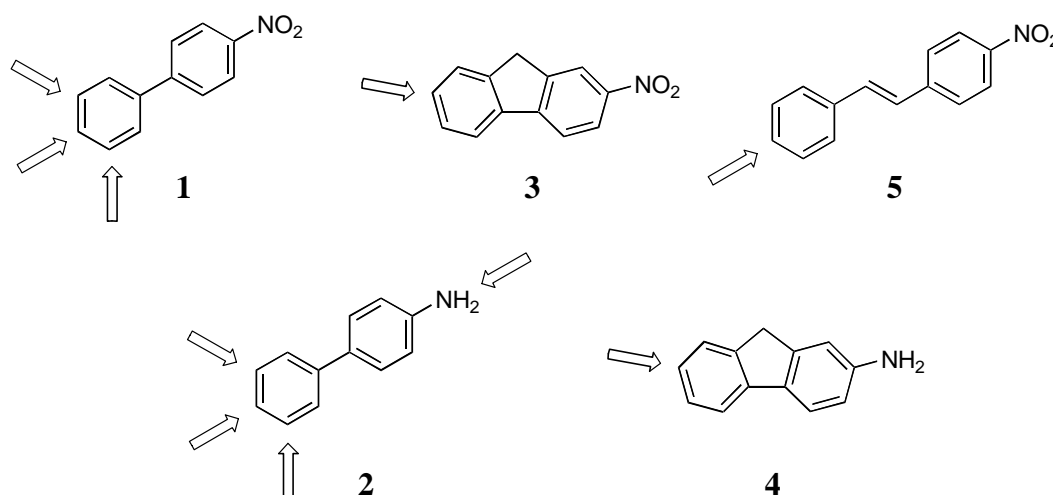
In wirtschaftlich erfolgreichen Gesellschaften rücken Arbeitsschutzmaßnahmen und Überlegungen, wie Gesundheitsgefahren für die Bevölkerung reduziert werden können, mehr und mehr in den Vordergrund. Der wichtigste Ansatz zur Senkung von Krebserkrankungen muß darin bestehen, die Exposition gegenüber Kanzerogenen auf ein Minimum zu reduzieren. Während die vom Lebensstil abhängigen Faktoren (Rauchen, Ernährung) weitgehend in der Hand jedes einzelnen liegen, kann der Gesetzgeber das Inverkehrbringen neuer (möglicherweise kanzerogener) Stoffe, sowie den gewerblichen Umgang mit bekanntermaßen kanzerogenen Stoffen regeln. In der Bundesrepublik Deutschland geschieht dies durch das Chemikaliengesetz (ChemG) und die dazugehörigen Verordnungen, deren Zweck es ist "*... durch Regelungen ... über den Umgang mit Gefahrstoffen den Menschen vor arbeitsbedingten und sonstigen Gesundheitsgefahren und die Umwelt vor stoffbedingten Schädigungen zu schützen ...*" (GefStoffV, § 1). So wird in der Chemikalienverbotsverordnung (ChemVerbotsV) das Inverkehrbringen bekannter Kanzerogene (Asbest, aromatischer Amine, etc.) und in der Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) der Umgang mit diesen Stoffen verboten bzw. stark eingeschränkt. Nach GefStoffV § 16 (2) ist der Arbeitgeber zudem verpflichtet, gefährliche Arbeitsstoffe und Produkte durch weniger gefährliche Verbindungen zu ersetzen (Substitutionsgebot). Dieser Ansatz verbirgt sich hinter dem Schlagwort der "Green Chemistry". Hier werden Strategien gesucht, mit denen durch chemische Modifikationen das Gefahrenpotential einer Verbindung gesenkt werden kann, ohne deren Struktur oder Anwendungsprofil grundlegend zu verändern.

A.3 Ziele und Aufbau dieser Arbeit

Unter den vielen mutagenen und kanzerogenen Substanzen haben vor allem aromatische Amine und Nitroaromaten eine enorme Bedeutung. Zahlreiche Vertreter dieser Stoffklassen werden in großem Umfang in der Industrie hergestellt und umgesetzt, sie bilden sich aber auch bei Verbrennungsprozessen (Diesel, Rauchen, etc.) oder beim Erhitzen von Fleisch und sind daher in der Umwelt weit verbreitet. Das hohe kanzerogene Potential solcher Verbindungen ist höchstwahrscheinlich mitverantwortlich für die ständige Zunahme von Krebserkrankungen in den Industrienationen. Aufgrund ihres Wirkmechanismus – sie sind genotoxisch und müssen metabolisch aktiviert werden (siehe Kapitel B) – besteht gerade bei Amino- und Nitroaromaten eine hohe Korrelation zwischen Kanzerogenität und Mutagenität. Die industrielle Nutzung dieser Stoffe stellt potentiell ein hohes Risiko für die menschliche Gesundheit dar und wird daher vom Gesetzgeber immer stärker eingeschränkt. Harnblasenkrebs, verursacht durch aromatische Amine, ist eine anerkannte Berufskrankheit, an der in den letzten 20 Jahren ~ 800 Arbeitnehmer gestorben sind.¹⁴ Die Industrie ist daher gefordert, ungefährlichere Ersatzstoffe zu entwickeln.

Genau an diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an. Auf welche Art müssen aromatische Amine und Nitroaromaten verändert werden, um ihr mutagenes Potential und damit ihre krebsauslösenden Eigenschaften zu verringern oder sogar völlig auszulöschen? Anhand von Modellsubstanzen, die von bekannten Kanzerogenen wie 4-Nitrobiphenyl **1**, 4-Aminobiphenyl **2**, 2-Nitrofluoren **3**, 2-Aminofluoren **4** und 4-Nitrostilben **5** abgeleitet sind, wird hier untersucht, wie sich strukturelle Veränderungen durch Modifikation der funktionellen Gruppe, vor allem aber durch die Einführung unterschiedlicher Substituenten (z.B. Alkyl-, CF₃-, Alkoxy- oder N,N-Dialkylaminogruppen) auf die Mutagenität der Grundkörper auswirken.

Abb. 2: Wie wirken sich strukturelle Modifikationen auf die Mutagenität aus?



Das Hauptaugenmerk richtet sich dabei auf sterische Aspekte, deren Bedeutung bisher weitgehend unterschätzt worden ist.

Die industrielle Bedeutung der untersuchten Modellsubstanzen selbst ist heute relativ gering. Strategien zur Reduktion des Gefahrenpotentials, die an diesen Beispielen ihre Wirksamkeit bewiesen haben, können jedoch auf strukturell ähnliche Verbindungen übertragen werden.

Die Arbeit ist in mehrere Teile gegliedert. In Kapitel 2 werden die molekularen Mechanismen der genotoxischen Wirkung von Amino- und Nitroaromaten erläutert. Im Speziellen wird in diesem Kapitel auf ihre metabolische Aktivierung und Adduktbildung mit der DNA eingegangen. Die Grundlagen des Ames-Test, der hier eingesetzt wurde, um das mutagene Potential der Modellverbindungen zu bestimmen, seine Durchführung, Auswertung und Aussagemöglichkeiten werden in Kapitel 3 ausführlich vorgestellt. Kapitel 4 beschäftigt sich mit den bisher bekannten Zusammenhängen zwischen Struktureigenschaften und mutagenem Potential. Dabei geht es einerseits um qualitative, andererseits um quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR), die zur Vorhersage der Mutagenität unbekannter Verbindungen genutzt werden können. Hier findet sich auch ein Überblick über alle hergestellten Modellschubstanzen – darunter viele, die bisher nicht beschrieben wurden. Ihre Darstellung in Anlehnung an bekannte Verfahren, besonders aber auch die Erforschung und Entwicklung neuer, effizienterer Synthesewege bilden den synthetischen Schwerpunkt dieser Arbeit und werden in Kapitel 5 behandelt. In Kapitel 6 werden schließlich die durchgeführten Struktur-Mutagenitäts-Untersuchungen erläutert, analysiert und mit den sich daraus ergebenden Schlußfolgerungen eingehend diskutiert. In Kapitel 7 folgt ein Vergleich der experimentellen Daten mit den Vorhersagen der QSAR-Gleichungen. Außerdem wird hier ausgeführt, wie diese Gleichungen modifiziert werden müssen, um auch den Einfluß sterischer Effekte richtig vorherzusagen. Nach der Zusammenfassung und einem Ausblick für zukünftige Arbeiten (Kapitel 8) werden im experimentellen Teil (Kapitel 9) die praktischen Arbeiten (Synthesen, Berechnungen) beschrieben. In Kapitel 10 ist die zitierte Literatur zusammengestellt.

B Aromatische Amine und Nitroverbindungen

B.1 Bedeutung, Vorkommen, Toxizität

Aromatische Amine und Nitroaromaten sind in der Industrie von enormer Bedeutung. Sie dienen als wichtige Ausgangsstoffe für die Herstellung von Farbstoffen, Polymeren, Kautschukchemikalien, Explosivstoffen (TNT), Pestiziden und Pharmazeutika und werden in großen Mengen produziert.¹⁵ Auch in zahlreichen Forschungslabors werden Amino- und Nitroaromaten synthetisiert und verwendet.

Außerhalb von Industrie und Forschungseinrichtungen ist der direkte Kontakt mit höheren Konzentrationen einfacher Amine (z.B. Anilin in Schuhcremes, Kugelschreiberminen; Phenylendiamin in Haarfärbemitteln, Zusatz als Antioxidationsmittel) vergleichsweise selten, in geringen Dosen sind sie in der Umwelt jedoch ubiquitär verbreitet. Amine sind im Mikrogrammaßstab im Zigarettenrauch¹⁶ enthalten, finden sich in Steinkohlenteer und können aus Azofarbstoffen durch Azoreduktasen in der Leber oder durch bakterielle Reduktion der Azo-Gruppe im Darm freigesetzt werden. Als Antioxidationsmittel sind aromatische Amine früher Polymeren wie z. B. Gummi zugesetzt worden. Heteroaromatische Amine entstehen beim Grillen und Braten von Fleisch oder Fisch.

Zahlreiche kommerziell erzeugte Amine sind giftig oder sehr giftig (Anilin und Derivate), reizen Lunge und Haut (Dermatitis durch *para*-Phenylendiamin) oder schädigen Nieren und Leber (Arylamine).¹⁷ Im Körper werden sie zu Hydroxylaminen metabolisiert, die das Eisen des Hämoglobins oxidieren und es dadurch unwirksam machen.

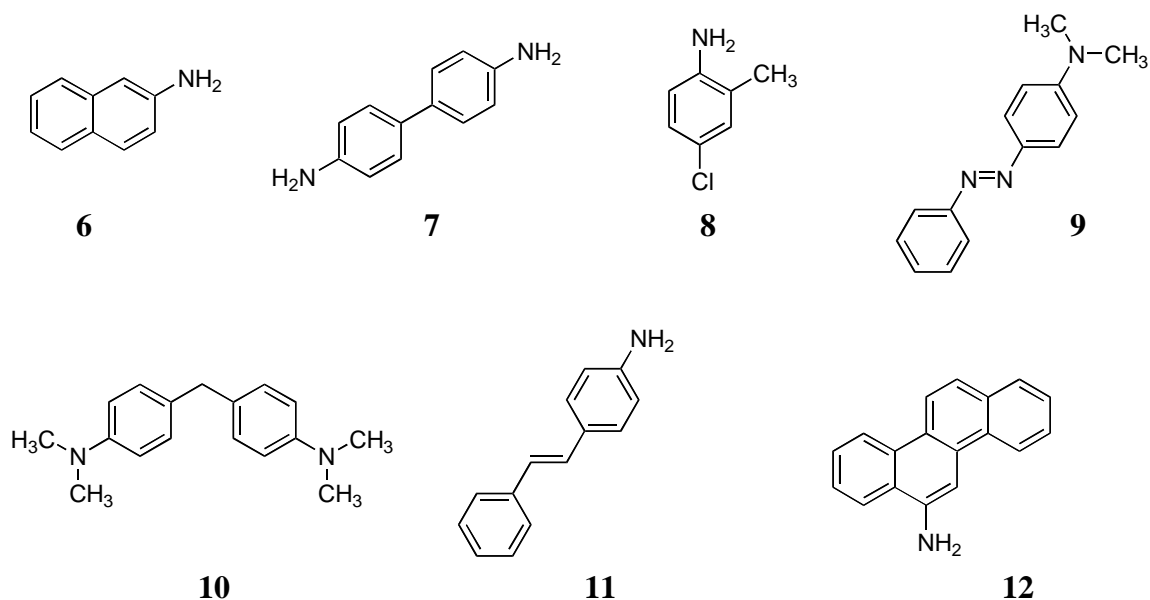
Abgesehen von ihrer industriellen Verwendung haben Nitroaromaten vor allem als Umweltschadstoffe Aufmerksamkeit erregt. Verbindungen wie 1-Nitropyren, 2-Nitrofluoren, 9-Nitroanthracen, 6-Nitrobenzo[a]pyren und ihre dinitrierten Derivate wurden in verunreinigter Stadtluft, in Diesel-ⁱ und Flugzeugabgasen, in Flugasche und sogar in Nahrungsmitteln entdeckt. Ihre Bildung erfolgt entweder bei Verbrennungsprozessen oder durch Reaktion von Kohlenwasserstoffen mit Stickoxiden in der Atmosphäre (z.B. aus Biphenyl und NO_x)¹⁸, wobei auch photochemische Reaktionen eine Rolle spielen. Beim Grillen beispielsweise werden Nitroaromaten nicht wie die heteroaromatischen Amine im Fleisch, sondern nur in den äußersten Schichten gebildet.

ⁱ Aus Dieselabgas hat man über 100 Nitroaromaten isoliert.

Die meisten Nitroaromaten sind akut mittelmäßig bis sehr toxisch. Ihre Giftwirkung beruht wie bei den Aminen auf ihrer Fähigkeit, Hämoglobin zu Methämoglobin zu oxidieren. Es wird dabei ein Kreisprozeß (Kiese-Zyklus)¹⁹ durchlaufen, an dem ihre Metaboliten – entsprechende Nitrosoverbindungen und Hydroxylamine – beteiligt sind.

Die hervorstechendsten chronischen Giftwirkungen der Amine und Nitroverbindungen sind ihre Kanzerogenität und Mutagenität. Auf Grundlage der bereits oben erwähnten Beobachtungen von Rehn (1895), zahlreichen Tierversuchen und epidemiologischen Studien wurden einige Amine als humankanzerogen eingestuft. Beim Menschen ist die Harnblase als Zielorgan von 4-Aminobiphenyl **2**, 2-Naphthylamin **6**, Benzidin **7** und 4-Chlor-*ortho*-toluidin **8** bekannt (Parkes und Evans, 1984).²⁰

Abb. 3: Kanzerogene/mutagene Amine/Azoverbindungen



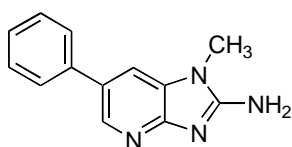
Etliche andere Amine sind eindeutig kanzerogen im Tierversuch (Nagetiere, Hunde), darunter viele industriell genutzte Verbindungen wie 6-Amino-2-ethoxynaphthalin, 4,4'-Methylen-bis-N,N-dimethylanilin **10**, Auramin und *ortho*-substituierte Benzidine. Weitere Beispiele sind solche Amine, die sich von konjugierten oder polycyclischen Aromaten ableiten wie 4-Aminostilben **11**²¹, 2-Aminofluoren **4**²², 2-Aminoanthracen²³, 6-Aminochrysen **12**²⁴, verschiedene Aminophenanthrene²⁵ und Aminopyrene²⁶ (Garner, 1984).²⁷ Ein aktueller Überblick stammt von Beland und Kadlubar²⁸. Auch etliche Azofarbstoffe wie 4-Dimethylaminoazobenzol **9** (Buttergelb)ⁱ oder Direct Red 28 (Benzidin als Grundgerüst) sind kanzerogen.

ⁱ Buttergelb diente früher zum Anfärben von Butter. Bereits 1923 wurde auf seine schädliche Wirkung hingewiesen, verboten wurde er aber erst, als es 1937 japanischen Toxikologen gelang, seine Kanzerogenität bei Ratten eindeutig nachzuweisen.

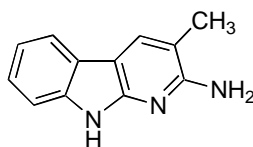
Auffällig ist, daß Amine Tumoren in Abhängigkeit von der Spezies in verschiedenen Organen erzeugen, die z.T. weit entfernt vom Applikationsort sind. Außer der Blase (Hunde) ist vor allem die Leber (Ratten) betroffen, daneben auch Milz, Schilddrüse und Brustdrüse.

Die Kanzerogenität heteroaromatischer Amine ist erst vergleichsweise kurz bekannt (seit Anfang der achtziger Jahre) und Gegenstand vieler aktueller Untersuchungen. Verbindungen wie 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) **13**, 3-Methyl-2-amino- α -carbolin (MeA α C) **14**, oder 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]chinoxalin (MeIQ) **15**, die vom Menschen nach Schätzungen durchschnittlich in Mikrogrammmengen¹⁷ täglich mit der Nahrung aufgenommen werden, erzeugen bei Ratten und Mäusen unter anderem Krebs in der Leber, im Darm und Vormagen.²⁹

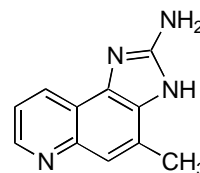
Abb. 4: Kanzerogene/mutagene heteroaromatische Amine



13



14



15

Durch Tierversuche an Ratten, Mäusen, Hamstern, Affen und Hunden ist auch die Kanzerogenität vieler Nitroaromaten (4-Nitrobiphenyl **1**, 2-Nitronaphthalin **16**, 2-Nitrofluoren **3**, 2,4,7-Trinitrofluoren-9-on **17**ⁱ, 2-Nitropyren **18**, etc.) klar erwiesen. Neben Blasenkrebs wurde Tumorbildung auch im Magen, im Darm, in den Brustdrüsen und auf der Haut beobachtet. Wegen fehlender epidemiologischer Studien sind bisher jedoch keine Nitroaromaten als humankanzerogen eingestuft worden. Auch einige Naturstoffe mit aromatischen Nitrogruppen wie Aristolochiasäureⁱⁱ **19** oder Chloramphenikolⁱⁱⁱ **20** stehen im Verdacht, kanzerogen zu sein.

Insgesamt scheinen Nitroaromaten etwas schwächer kanzerogen als entsprechende Amine zu sein.^{17,28} Ein ausführlicher Übersichtsartikel über Mutagenität und Kanzerogenität von polycyclischen Nitroaromaten stammt von Tokiwa.³⁰

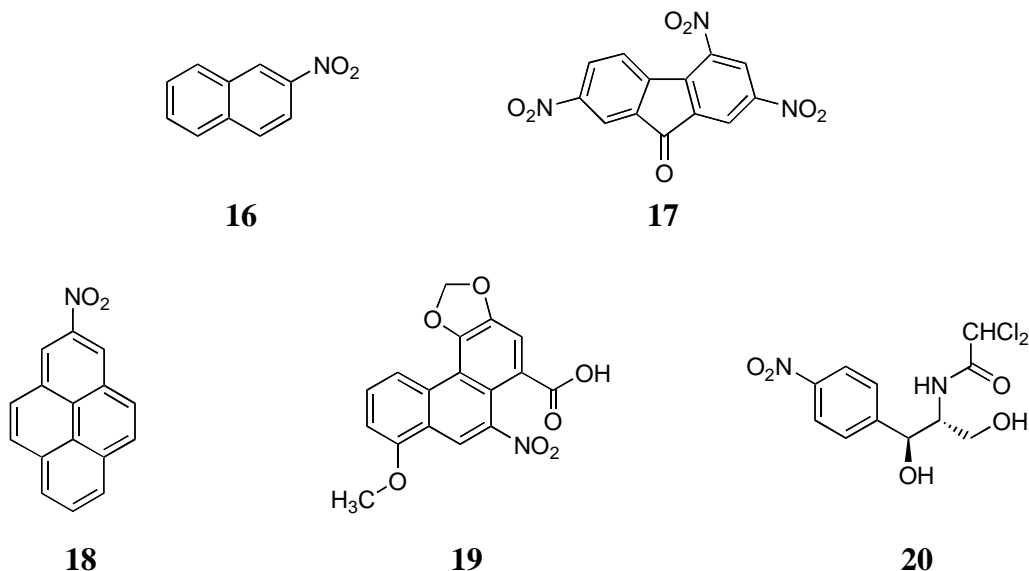
ⁱ 2,4,7-Trinitrofluoren-9-on wird als photoelektrisch aktive Substanz in Fotokopiergeräten eingesetzt.

ⁱⁱ Zubereitungen mit Aristolochiasäure, die man über Jahre als Medikament eingesetzt hatte, wurden wegen der vermuteten kanzerogenen Wirkung bereits 1981 verboten.

ⁱⁱⁱ Chloramphenikol, ein Breitbandantibiotikum, wurde 1947 von Burkholder aus dem Pilz *Streptomyces venezuelae* isoliert. Es wird in großen Mengen synthetisch hergestellt und unter den Handelsnamen Paraxin® und Leukomycin® vertrieben. Aufgrund der Nitrogruppe ist diese Verbindung ebenfalls ein potentielles Mutagen.

Die meisten Vertreter aus diesen Verbindungsklassen sind erwartungsgemäß hochaktiv in verschiedenen Genotoxizitätsassays. Sie bewirken neben Punkt- und Rastermutationen DNA-Einzelstrangbrüche, Schwesterchromatidaustausch³¹, Störungen der DNA-Synthese und induzieren DNA-Repair-Prozesse.³²

Abb. 5: Kanzerogene/mutagene Nitroaromaten



B.2 Aufnahme und metabolische Aktivierung

Aromatische Amine und Nitroverbindungen gehören zur Klasse der indirekten Kanzerogene und müssen daher erst zu reaktiven Elektrophilen metabolisiert werden, um mutagen und kanzerogen wirksam zu sein. Die grundlegenden Aktivierungsschritte sind bei Aminen und Nitroverbindungen ähnlich, die beteiligten Enzyme und die Reaktion der Metaboliten mit der DNA sind heute weitgehend geklärt.ⁱ

Arylamine und Nitroaromaten werden über den Gastrointestinaltrakt, die Atemwege und bis auf wenige Ausnahmen über die Haut sehr gut resorbiert und im ganzen Körper verteilt. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend erst nach Metabolisierung, bei den monocyclischen Verbindungen hauptsächlich über die Niere, bei bi- und polycyclischen Aminen und Nitroverbindungen mehr über den Darm. Generell wird die Ausscheidung durch die physikochemischen

ⁱ Eine der wichtigsten Funktionen des Fremdstoffmetabolismus besteht darin, schwer ausscheidbare, lipophile Stoffe zu leichter ausscheidbaren hydrophilen Stoffen zu metabolisieren. Dabei werden zwei Phasen unterschieden. Der Phase 1 Metabolismus wandelt apolare, hydrophobe Stoffe durch Oxidationen (z.B. Epoxidierung, Hydroxylierung, Dealkylierung), Reduktionen (Nitro, Azo, Carbonylreduktion) oder Hydrolyse (Ester, Amide) in polare Verbindungen um, die funktionelle Gruppen enthalten und im Phase 2 Metabolismus weiter umgesetzt werden. In Phase 2 erfolgt die Konjugation von Fremdstoffen oder Phase 1 Metaboliten mit sehr hydrophilen endogenen Molekülen (Sulfatierung, Glucuronidierung, Glutathionkonjugation, Acetylierung, Konjugation mit Aminosäuren, Methylierung). Diese Metaboliten können dann sehr leicht ausgeschieden werden.

Eigenschaften des jeweiligen Stoffes begrenzt, besonders durch seine molekulare Masseⁱ und seine Hydrophobie (Lipophilie). Zur Quantifizierung der Hydrophobie eines Stoffes *A* dient der Verteilungskoeffizient *P* (bzw. sein Logarithmus $\log P$), der als Konzentrationsverhältnis des Stoffes zwischen einer unpolaren Phase (1-Octanol) und einer polaren Phase (Wasser) definiert ist.

$$\log P_A = \log ([A]_{\text{Octanol}} / [A]_{\text{Wasser}}) \quad (1)$$

Arylamine und vor allem Nitroaromaten mit großem aromatischen Gerüst oder unpolaren Substituenten sind in der Regel sehr hydrophob und erreichen hohe $\log P$ -Werte. Solche Substanzen werden in der Niere oder im Darm zum größten Teil wieder rückresorbiert und daher nur langsam ausgeschieden oder sogar im Fettgewebe gespeichert.

Aufgrund ihrer geringen Reaktivität können aromatische Amine **21** und Nitroverbindungen **24** mit der DNA selbst (abgesehen von Interkalation) nicht reagieren. Tatsächlich kommt bei der Mutagenese ihren Metaboliten, besonders den Hydroxylaminen **22**, eine Schlüsselrolle zu. Einen Überblick der wichtigsten Metabolisierungswege gibt Abb. 6.

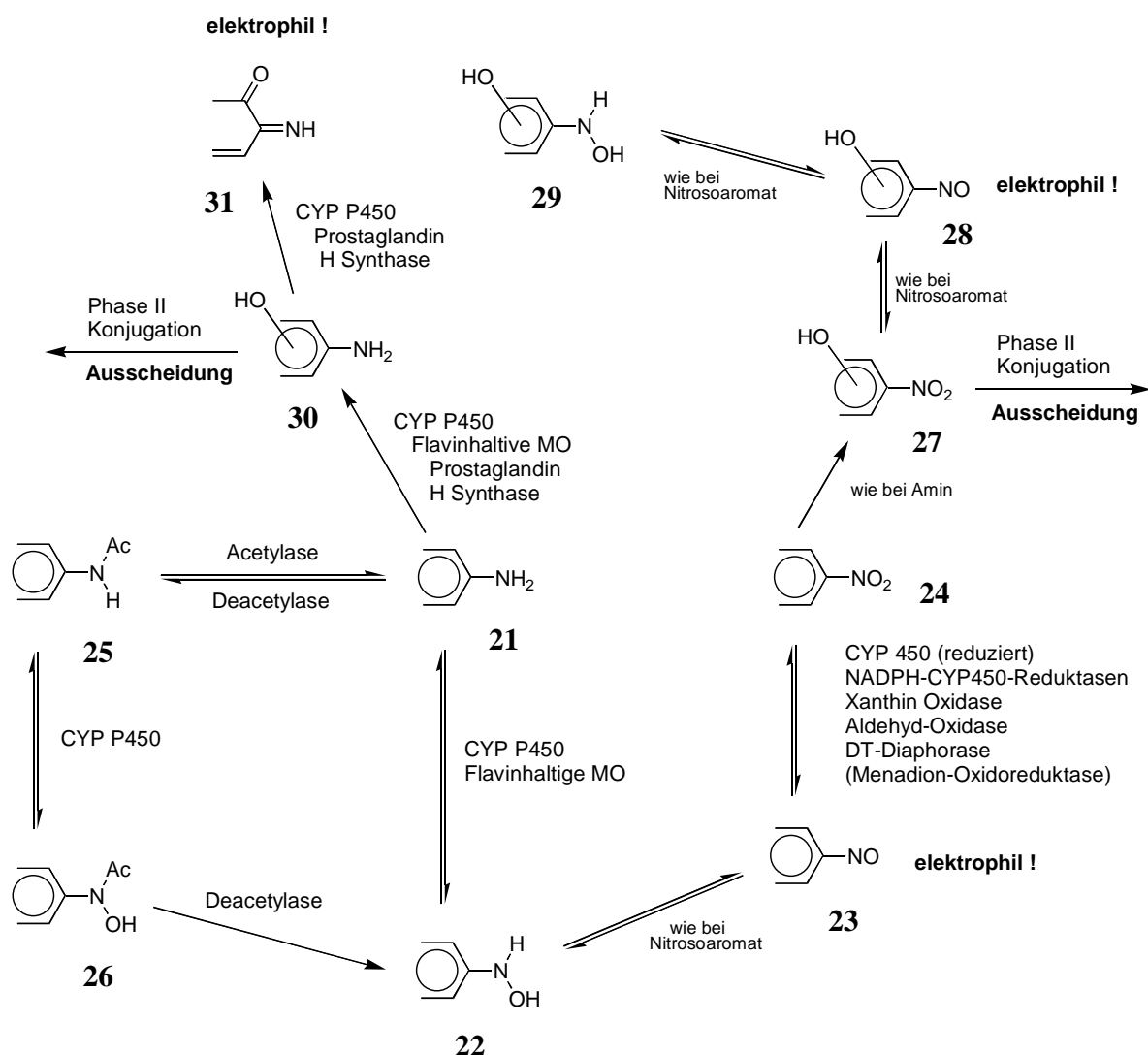
Hydroxylamine **22** entstehen überlicherweise in den Leberzellen aus Aminen **21** durch N-Hydroxylierung in Gegenwart von Sauerstoff – ein Prozeß, der durch die im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Cytochrome P450 (CYP 450) katalysiert wird. Es existieren zahlreiche verschiedene Cytochrome P450 in jeweils einer einzigen Spezies, die in Familien (CYP1, CYP2, etc.) und Unterfamilien (CYP1A, CYP1B, etc.) aufgeteilt werden und zudem einem genetischen Polymorphismus unterliegen.ⁱⁱ Beim Menschen spielt das Enzym CYP1A2 die wichtigste Rolle für die N-Hydroxylierung. Speziell bei sekundären und tertiären Alkyl-Aryl-Aminen wird die N-Oxidation zusätzlich durch Flavin-enthaltende Monooxygenasen (MO) katalysiert, während primäre Amine durch dieses Enzym nicht aktiviert werden. Die Beteiligung von Prostaglandin H Synthase an der N-Oxidation ist umstritten.²⁸

Chemisch stellt die N-Oxidation zum Hydroxylamin eine Umpolungsreaktion dar, bei der das nukleophile Amin in ein potentiell elektrophiles Teilchen umgewandelt wird, das nach Aktivierung der Abgangsgruppe (siehe weiter unten) prinzipiell in der Lage ist, mit nukleophilen Biomolekülen weiterzureagieren. Außer der DNA werden z.B. auch Proteine angegriffen und bilden Addukte (die hier nicht diskutiert werden).

ⁱ Makromoleküle mit einem Molekulargewicht >60 kd (Dalton) können beispielsweise nicht über die Niere ausgeschieden werden.

ⁱⁱ Genetischer Polymorphismus bedeutet, daß es im genauen Aufbau des Enzymes von Individuum zu Individuum leichte Unterschiede gibt.

Abb. 6: Aktivierung von Aminen, N-Acetylaminen und Nitroaromaten



Anstelle der direkten N-Hydroxylierung können Amine durch cytosolische Acetyltransferasen (z.B. AT1, AT2, genetisch polymorph → schnelle und langsame Acetylierer) auch N-acyliert werden. Da die oxidative Aktivierung (N-Hydroxylierung) bei den so gebildeten aromatischen Amiden **25** aufgrund der geringeren Elektronendichte am Stickstoff wesentlich langsamer verläuft als bei den Aminen, ist eine effiziente N-Acetylierung als Entgiftungsreaktion zu bewerten.³⁴ Ein Teil der Amide **25** wird vor der Ausscheidung allerdings dennoch zu den entsprechenden Hydroxamsäuren **26** oxidiert. Diese können durch N-Deacetylierung ebenfalls in Hydroxylamine **22** transformiert werden. Der umgekehrte Weg (**22** → **26**), die N-Acetylierung von Hydroxylaminen, scheint keine größere Bedeutung zu haben.¹⁹⁵

Ausgehend von Nitroaromaten **24** erfolgt die Bildung der entsprechenden Hydroxylamine **22** durch schrittweise Reduktion über Nitrosoverbindungen **23** als Zwischenstufe.³³ Die dafür benötigten Reduktionsenzyme finden sich bei Säugetieren im Cytosol und in den Mikrosomen

der Leber. Unter Beteiligung von Xanthin-Oxidase, Aldehyd-Oxidase, Cytochrom P450, Cytochrom-P450-Reduktase oder von DT-Diaphorase (Menadion-Oxidoreduktase)^{28,34} – einem hierbei besonders wichtigem Enzym, das außer in der Leber auch in vielen anderen Organen vorkommt, laufen solche Reduktionen bevorzugt in sauerstoffarmen Geweben ab.ⁱ Entsprechende Nitroreduktasen wurden auch in Bakterien nachgewiesen.³⁵ Die redoxamphoteren Hydroxylamine **22** selbst sind in der Regel wenig stabil und können entweder wieder in die Aminstufe **21** überführt oder zum Nitrosoaromat **23** reoxidiert werden. Der Metabolismus von Aminen und Nitroverbindungen ist also eng miteinander verknüpft (Kiese-Zyklus).

Neben den Veränderungen der Amino- oder Nitrogruppe finden metabolische Oxidationsprozesse auch am aromatischen Kohlenstoffgerüst statt (Abb. 6, C-Oxidation zu **27** und **30**). So fand man bei Metabolismusstudien von Nitrobenzol in Ratten und Mäusen unter anderem *meta*-Nitrophenol, *para*-Nitrophenol, Anilin, *para*-Aminophenol und N-Acetyl-4-aminophenol.³⁶ Inkubation von 4-Nitrobiphenyl mit den aktiven Enzymen aus Rattenleber (S9-Mix, siehe Ames-Test) belegte die Bildung von 4-Aminobiphenyl, N-Acetyl-4-aminobiphenyl, N-Hydroxy-N-acetyl-4-aminobiphenyl, x-Hydroxy-4-nitrobiphenylⁱⁱ und drei verschiedenen ringhydroxylierten 4-Aminobiphenylen.³⁷ *In vivo* Studien in Ratten über die Metabolisierung von 2-Nitrofluoren ergaben – je nach Applikationsart (oral, pulmonal) – 2-Aminofluoren, N-Acetyl-2-aminofluoren, 9-Hydroxy-2-nitrofluoren und andere ringhydroxylierte Derivate von N-Acetyl-2-aminofluoren und 2-Nitrofluoren.³⁸

Im Gegensatz zur N-Hydroxylierung können Ringhydroxylierungen an Amino-/Nitrophenyl-, biphenyl-, fluorenyl- und ähnlichen Systemen sowohl zur Detoxifikation als auch zur Toxifikation beitragen. Die neu eingeführte Hydroxygruppe ermöglicht einerseits die Konjugation mit hydrophilen endogenen Molekülen (Sulfatierung, Glucuronidierung), so daß die Ausscheidung des Stoffes durch Erniedrigung des log P-Wertes stark erleichtert wird.ⁱⁱⁱ Andererseits können die hydroxylierten Verbindungen, bevor sie konjugiert und ausgeschieden werden, durch Metabolisierung der Amino-/Nitrogruppe zu **28** (Nitrosoaromat) oder **29** (Hydroxylamin) auch selbst ihr mutagenes Potential entfalten. Während die Ringoxidation bei Aminen in der Regel eine Verringerung oder Auslöschung der Aktivität zur Folge hat (hydroxylierte 4-Aminobiphenyle¹⁹⁴ oder 7-Hydroxy-2-aminofluoren¹⁹⁵ sind z.B. inaktiv bzw. sehr

ⁱ Rein formal gesehen sind alle diese Reduktionsschritte 2-Elektronenprozesse. Es ist aber bekannt, daß bei der Reduktion mit Cytochrom P450 die Elektronen einzeln in zwei aufeinanderfolgenden Schritten übertragen werden. DT-Diaphorase ist dagegen ein typisches Zwei-Elektronen-Transfer-Enzym.

ⁱⁱ Die Position der Hydroxygruppe ist nicht bekannt.

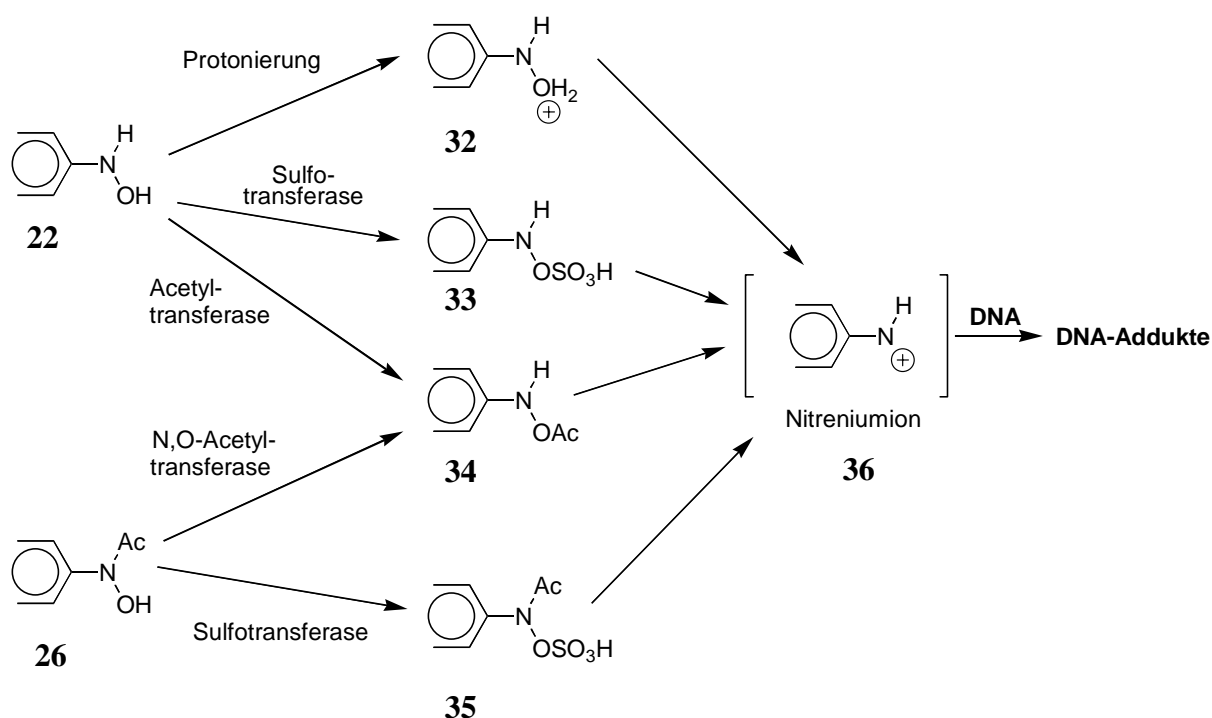
ⁱⁱⁱ Entsprechende Konjugate wurden bei den erwähnten Metabolismusstudien im Urin und Blut der Versuchstiere gefunden.³⁶

schwach mutagen), bewirkt die Einführung von Hydroxygruppen bei Nitroaromaten häufig den Erhalt oder sogar eine Zunahme der Mutagenität (9-Hydroxy-2-nitrofluoranthren und hydroxylierte Metaboliten von 2-Nitrofluoren sind z.B. stärker mutagen als ihre Grundkörper^{39,38}). Gerade bei größeren polycyclischen Amino- und Nitroaromaten kann die Ringoxidation durch Epoxidierung – wie bei unsubstituierten aromatischen Kohlenwasserstoffen – auch unabhängig von der Metabolisierung der Nitro oder Aminogruppe eine erhöhte Mutagenität bewirken.⁴⁰

Neben den N-Hydroxylierungen und Ringhydroxylierungen sind in einigen Fällen noch andere oxidative Aktivierungen von Bedeutung (Abb. 6). Metabolisch gebildete *ortho*- oder *para*-Aminophenole **30** werden beispielsweise nicht zu **29** N-hydroxyliert, sondern zu den elektrophilen Iminochinonen **31** weiteroxidiert, die ebenfalls Addukte mit der DNA bilden (z.B. beim 2-Naphthylamin). Solche Oxidationen werden durch Cytochrome P450 oder Peroxidasen (z.B. Prostaglandin H Synthase) katalysiert.⁴¹

Nitrosoverbindungen **23** haben zwar elektrophile Eigenschaften, eine direkte Reaktion mit der DNA scheint aber nur über die Hydroxylamine **22** oder die Hydroxamsäuren **26** zu erfolgen.⁴² Im Normalfall ist die OH-Gruppe der Hydroxylamine **22** und der Hydroxamsäuren **26** jedoch eine vergleichsweise schlechte Abgangsgruppe. Daher ist eine Aktivierung der Hydroxygruppe notwendig.

Abb. 7: Aktivierung der Hydroxylamine und Hydroxamsäuren



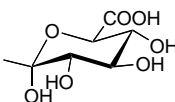


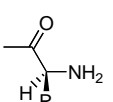


Unter schwach sauren Bedingungen, wie sie etwa im Urin vorliegen, wird die Hydroxygruppe protoniert (**32**) und die Bindung zwischen Stickstoff und Sauerstoff leicht gespalten. Es kommt zur Bildung hochreaktiver Nitreniumionen **36**, die mit der DNA Addukte bilden können (Abb. 7). Neben der Protonierung wird die Hydroxygruppe durch enzymatische Veresterung in eine bessere Abgangsgruppe überführt. Am wichtigsten sind dabei die O-Acetylierung und die O-Sulfatierung.

Die Acetylierung der Hydroxylamine (**22** → **34**) erfolgt unter Katalyse von Acetyltransferasen, die als cytosolische Enzyme in der Leber und vielen anderen Organen vorkommen, durch Transfer der Acetylgruppe aus Acetyl-Coenzym A auf die Hydroxygruppe. Eine andere Möglichkeit zur Bildung der N-Acetoxy-arylamine **34** geht von den Arylhydroxamsäuren **26** aus, die unter Beteiligung derselben Enzyme einen intramolekularen N,O-Acetyltransfer eingehen (**26** → **34**).⁴³ Die Übertragung von Sulfatresten aus 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf den Sauerstoff der Hydroxylamine (**22** → **33**) wird durch Sulfotransferasen ermöglicht. Hydroxamsäuren können ebenfalls O-sulfatiert werden (**26** → **35**) und dann als Elektrophile Addukte bilden.

Daneben kennt man noch eine Reihe anderer Aktivierungsreaktionen, über deren Bedeutung zur Steigerung des mutagenen oder kanzerogenen Potentials allerdings weit weniger bekannt ist. Einen Überblick gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Enzymatische Veresterung

Reaktionstyp	Enzym/ Cosubstrat	übertragene Gruppe
Acetylierung	Acetyltransferase, AcCo A	
Sulfatierung	Sulfotransferase, PAPS	
Glucuronidierung	Glucuronosyltransferase, UDP-Glucuronsäure	
Phosphorylierung	Mg ²⁺ , ATP-Kinase	
Carbaminylierung	O-Carbamoyl-Transferase	
O-α-Aminoacylierung	ATP, T-RNA-Synthetase	

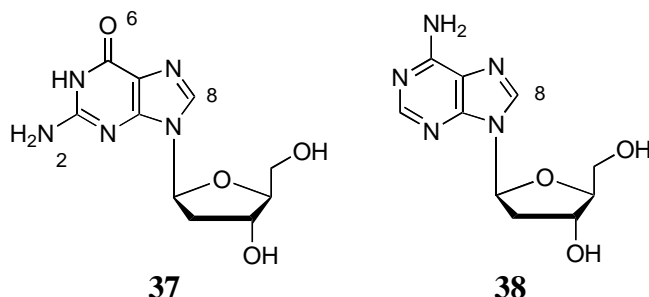
Da O-veresterte Hydroxylamine **34** extrem reaktiv sind, können sie durch Metabolismustudien meist nicht direkt detektiert werden. Ihre Bildung ist aber durch vergleichende Mutagenitätsuntersuchungen mit speziellen Bakterienstämmen in Gegenwart und in Abwesenheit der Aktivierungsenzyme eindeutig belegt worden (siehe auch in Kapitel C.2). Weitere Hinweise stammten von Flammang, der durch *in vitro* Studien die Aktivierung aller wichtigen Modellkanzerogene durch Acetylierung nachgewiesen hat.⁴⁴ In unserem Arbeitskreis konnten die O-Acetylderivate von Phenylhydroxylamin⁴⁵, 2-Naphthylhydroxylamin⁴⁶, 4-Biphenylhydroxylamin⁴⁷ und 2-Fluorenylhydroxylamin⁴⁸ erstmalig rein hergestellt und vollständig charakterisiert werden. Ihre *in vitro* Reaktion mit DNA ergab dieselben Addukte wie bei den oben beschriebenen *in vivo* Studien. Auch die Aktivierung durch α -Aminosäuren ist durch Synthese entsprechender Zwischenstufen (O- α -Aminoacylhydroxylamine) belegt worden.⁴⁹

B.3 Adduktbildung

B.3.1 Addukte von Amino-/Nitrobiphenyl, -fluoren und -stilben

Schon lange ist bekannt, daß Nitreniumionen oder aktivierte Hydroxylamine bei der Reaktion mit der DNA nicht alle Basen gleichermaßen angreifen. Das bevorzugte Zielmolekül ist das Nukleosid Desoxyguanosin dG **37**, wobei hauptsächlich die C8- und die N²-Positionen des Purin-Gerüsts reagieren. Untersuchungen zum Mechanismus der C8-Adduktbildung haben gezeigt, daß dabei primär ein N7-Addukt entsteht, das sich zum C8-Addukt umlagert.⁵⁰ Adduktbildung über O⁶, wie sie häufig bei Umsetzung mit Alkylierungsreagenzien gefunden wird, tritt bei Amino-/Nitroaromaten nur selten auf und scheint nur eine Nebenrolle zu spielen. In deutlich geringerem Ausmaß ist auch Desoxyadenosin dA **38** von der Adduktbildung betroffen. Die Pyrimidinbasen Desoxythymidin und Desoxycytidin reagieren dagegen nicht.

Abb. 8: Desoxyguanosin **37** und Desoxyadenosin **38**

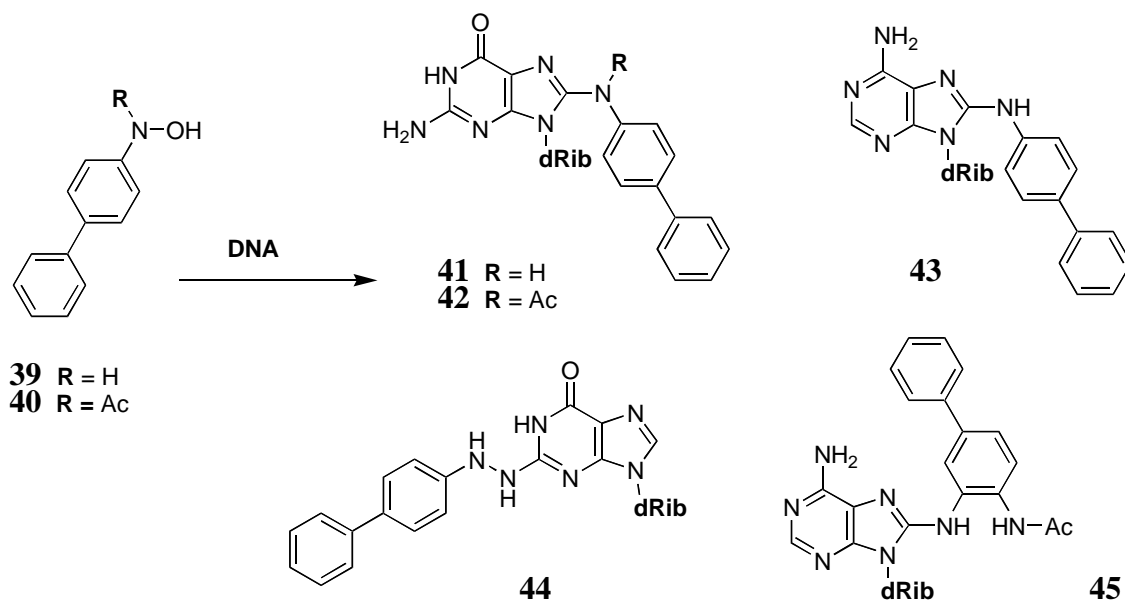


Aus vielen Fütterungsstudien weiß man, daß die Reaktion eines aktivierten Aromaten (Hydroxylamin oder reaktiver Ester) in der Regel zur Bildung mehrerer Addukte führt. Im fol-

genden sollen die Addukte der in dieser Arbeit untersuchten Modellkanzerogene **1**, **2** (Biphenyl), **3**, **4** (Fluoren) und **5** (Stilben) kurz vorgestellt werden.

Nach Verabreichung von N-Hydroxy-4-aminobiphenyl **39** konnten Beland und Kadlubar aus der Blasen-DNA von Hunden die Addukte **41** (76 %), **43** (9 %) und **44** (15 %) isolieren (Abb. 9).⁵¹ *In vitro* Versuche zur Umsetzung von N-Hydroxy-4-aminobiphenyl **39** mit Kalbsthymus-DNA bei pH 5 lieferten dieselben Addukte **41** (70 %), **43** (15 %) und **44** (5 %) in ganz ähnlichen Ausbeuten.^{58a} Das N²-Addukt **44** mit der Hydrazo-Bindung ist dabei ein relativ ungewöhnlicher Addukt-Typ, der abgesehen von diesem Beispiel bisher nur noch beim Benzidin beobachtet wurde.

Abb. 9: Addukte von 4-Aminobiphenyl

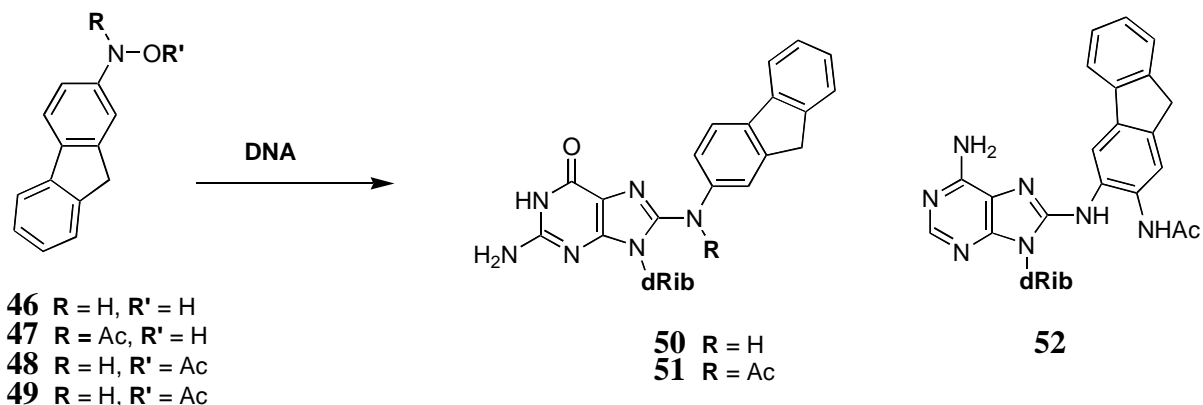


Mit Hilfe der ³²P-Postlabeling-Technik untersuchten Gupta und Dighe die DNA-Addukte nach Applikation von N-Hydroxy-N-acetyl-4-aminobiphenyl **40** an Ratten.⁵² Das Hauptaddukt (70 %) in Rattenleber wurde wieder als **41** identifiziert, dessen Bildung durch Acetyltransfer oder eine Sequenz aus N-Deacetylierung und O-Acetylierung zu N-Acetoxy-4-aminobiphenyl **39** erklärt werden könnte. Daneben fand man aber noch die acetylierten Addukte **42** (13 %), **45** und ein anderes Addukt, das nicht charakterisiert werden konnte.

2-Nitrofluoren **3**, 2-Aminofluoren **4**, N-Acetyl-2-aminofluoren oder N-Acetyl-2-hydroxylaminofluoren **47** bilden N-(Desoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluoren **50** als Hauptaddukt, wie durch etliche Fütterungsstudien (Mäuse, Ratten, etc.) bewiesen worden ist. Nur in einigen Fällen konnte man zusätzlich zwei weitere Addukte – nämlich die acetylierten Verbindungen **51** und **52** – in deutlich geringeren Mengen beobachten.

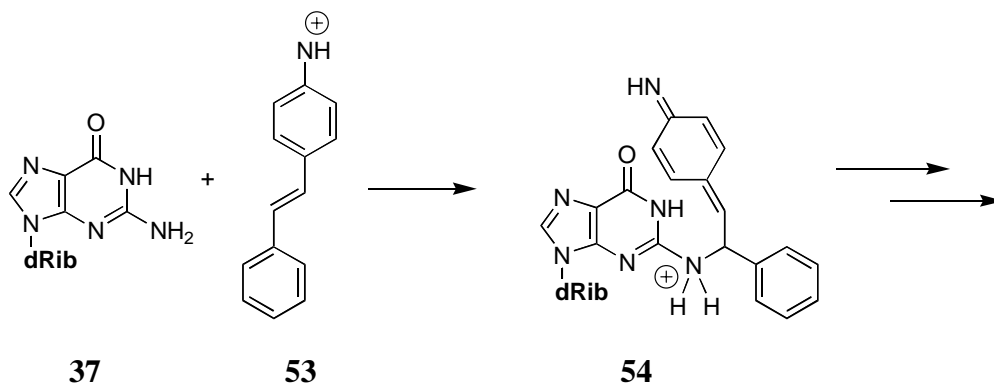
Auch *in vitro* Untersuchungen ergaben ein ähnliches Ergebnis. So beschrieb Kriek bereits 1965 die Bildung von **50** bei Umsetzung von N-Hydroxy-2-aminofluoren **46** mit DNA.⁵³ Arbeiten aus unserem Arbeitskreis zeigten, daß der entsprechende aktivierte Ester **48** selbst bei tiefen Temperaturen mit Desoxyguanosin zu **50** reagiert.⁴⁸

Abb. 10: Addukte von 2-Aminofluoren und Derivaten



Bei Stilbenen sind die Verhältnisse aufgrund der Doppelbindung etwas komplizierter. 4-Aminostilben oder 4-Nitrostilben werden zwar analog wie die anderen Amino-/Nitroaromaten durch N-Hydroxylierung und Veresterung aktiviert, das entstehende Nitreniumion **53** hat jedoch am Stickstoff und an der Doppelbindung zwei elektrophile Reaktionszentren. Beim Angriff von **37** auf die Doppelbindung entsteht z.B. Verbindung **54**, die intramolekular mit der angegriffenen Base oder intermolekular mit einem anderen Nukleophil (z.B. Wasser) weiterreagieren kann. Nach Analyse der bisher gefundenen Addukte scheint die Reaktion mit Bionukleophilen wie der DNA sogar ausschließlich über die Doppelbindung zu erfolgen.²⁸

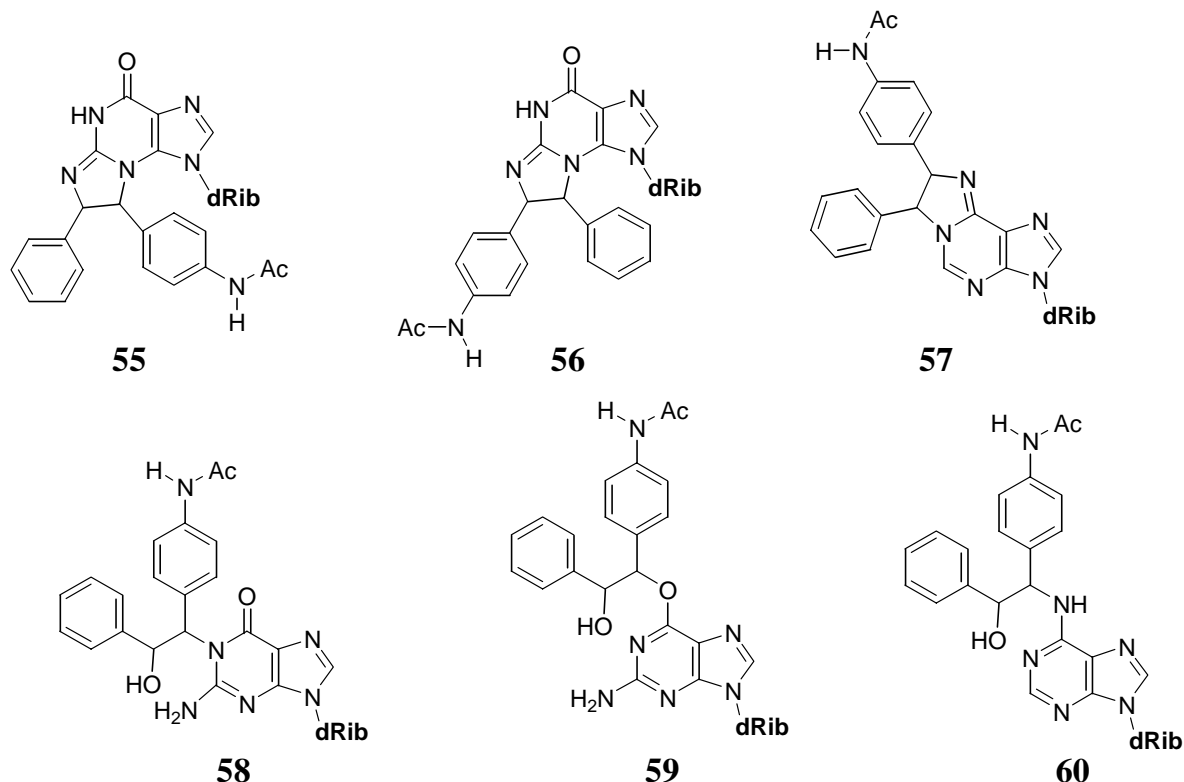
Abb. 11: Adduktbildung bei Stilbenderivaten



Obwohl schon eine größere Anzahl von DNA-Addukten charakterisiert worden ist – hauptsächlich von Guanosin, aber auch von Adenosin – nimmt man an, daß die Mehrzahl der *in*

vivo gebildeten Addukte bisher unbekannt sind. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, daß es nach dem Angriff auf die Doppelbindung zur Verknüpfung mit einer benachbarten Base kommt und so keine einheitlichen Addukte entstehen. Eine Auswahl der bisher beschriebenen Addukte ist in Abb. 12 zusammengestellt.²⁸

Abb. 12: Addukte von *N*-Acetyl-4-aminostilben



B.3.2 Addukte und mutagenes Potential

Ein Faktor, der das mutagene Potential einer Verbindung bestimmt, ist die Anzahl der gebildeten DNA-Addukte. Je mehr Addukte entstehen, desto mehr Fehler treten bei der Replikation auf und desto größer ist das mutagene Potential eines Stoffes. Eine vergleichende Tierstudie, bei der äquimolare Mengen von *N*-Hydroxy-*N*-acetyl-4-aminobiphenyl **40** und *N*-Hydroxy-*N*-acetyl-2-aminofluoren **47** verabreicht wurden, ergab beispielsweise, daß das stärker mutagene *N*-Hydroxy-*N*-acetyl-2-aminofluoren **47** vier- bis zehnmals häufiger an die DNA gebunden wurde als *N*-Hydroxy-*N*-acetyl-4-aminobiphenyl **40**.

Nach heutigem Kenntnisstand ist die Anzahl der Addukte jedoch nicht allein ausschlaggebend wie stark mutagen oder kanzerogen eine Substanz wirklich ist. So ist gerade für die Krebsentstehung entscheidend, welche Gene von den Mutationen betroffen sind.⁵⁴ Da die Struktur der aktivierten Amino- und Nitroaromaten einen Einfluß darauf hat, welche Basensequenzen angegriffen werden,⁵⁵ haben Verbindungen, die bevorzugt in wichtigen Kontrollgenen Addukte

bilden – z.B. weil dort bestimmte Basensequenzen häufiger auftreten –, ein stärkeres kanzerogenes Potential als solche, die weniger spezifisch reagieren. Speziell bei Arylaminen wie 2-Aminofluoren oder 4-Aminobiphenyl konnte beispielsweise die Bildung von Lebertumoren mit G → T Transversionen in der ersten Base des Codons 61 im *ras* Proto-Onkogenⁱ korreliert werden.⁵⁶

Auch nach der Adduktbildung spielt die Struktur weiterhin eine wichtige Rolle. So reagieren 4-Aminobiphenyl und 2-Aminofluoren zwar zu vergleichbaren Addukten in Mäuseleber, die DNA-Addukte von 2-Aminofluoren (z.B. N-(Desoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluoren **50**) induzierten jedoch doppelt so viele Tumore wie entsprechende Addukte von 4-Aminobiphenyl (z.B. N-(Desoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl **41**).⁵⁷ Ähnliche Effekte ergaben Mutagenitätsuntersuchungen einer Reihe von Aminen und Nitroaromaten in *Salmonella typhimurium* TA1538 (vgl. Kapitel C). Beim Vergleich der Mutationsinduktion durch die gebildeten Desoxyguanosin-Addukte fand man im Hinblick auf die Effizienz starke Unterschiede: N-Acetylbenzidin > 1-Nitropyren ~ 1,6-Dinitropyren ~ 1,8-Dinitropyren > 2-Aminofluoren > 4-Aminobiphenyl > 2-Naphthylamin.⁵⁸ Interessanterweise ist auch die Persistenzⁱⁱ der Addukte stark von der Struktur der Addukte abhängig. So werden z.B. N-acetylierte Addukte meist schneller durch Reparaturprozesse entfernt als ihre nicht-acetylierten Analoga, und Addukte von 2-Aminofluoren schneller als die von 4-Aminobiphenyl.²⁸

Auf Grundlage zahlreicher neuerer Studien gilt es als relativ sicher, daß Unterschiede in der Mutations- bzw. Tumorbildungseffizienz eng mit der dreidimensionalen Gestalt der veränderten DNA in Verbindung stehen. Der betroffene DNA-Abschnitt kann als Folge der Adduktbildung in mehreren Konformationen vorliegen, die sich unterschiedlich auf die Entstehung von Mutationen auswirken. Diese konformative Heterogenität (conformational heterogeneity), die bei einzelnen Addukt-modifizierten Nukleotiden schon länger bekannt ist, wurde durch NMR-Methoden (¹H, ¹³C, ¹⁹F) mittlerweile auch bei längeren Addukt-modifizierten DNA-Doppelsträngen eindeutig nachgewiesen und scheint bei einer großen Anzahl der verschiedensten DNA-Addukte aufzutreten. In einigen Fällen konnten die hauptsächlich auftretenden Konformationen charakterisiert und mit der Mutationseffizienz korreliert werden.

Möglicherweise sind konformative Effekte auch für die unterschiedliche Persistenz der Addukte in der Leber von Hunden verantwortlich. Während Guanosin-C8-Addukte von

ⁱ Proto-Onkogene kodieren Proteine, die an der Kontrolle normaler Wachstums- und Differenzierungsprozesse beteiligt sind und die Zellproliferation steuern. Durch Mutationen gewinnen Proto-Onkogene die Eigenschaft von Onkogenen – sie können Tumoren auslösen, wenn gleichzeitig die Kontrolle durch Tumor-Suppressorgene (z.B. p53) gestört ist.

ⁱⁱ Persistenz bedeutet hier Verweildauer im Organismus.

4-Aminobiphenyl, von denen bekannt ist, daß sie die normale DNA-Konformation weniger stören als 2-Aminofluoren-C8-Addukte, nur sehr langsam entfernt werden, erfolgt die Reparatur der 2-Aminofluorenaddukte wesentlich schneller.^{58a} Auf die konformative Heterogenität wird in Kapitel F noch genauer eingegangen.

B.4 Tests für Mutagenität und Kanzerogenität

Grundvoraussetzung, um das Risiko durch Chemikalien für den Menschen zu senken, ist die Kenntnis ihres Gefährdungspotentials. Prinzipiell am aussagekräftigsten ist die experimentelle Erfassung von kanzerogenen Wirkungen durch Tierversuche (Hunde, Hamster, Ratten, Mäuse, etc.), da sich diese Ergebnisse am ehesten auf den Menschen übertragen lassen. Tatsächlich sind einige Humankanzerogene erst aufgrund ihrer Wirkung im Tierexperiment entdeckt worden (Aflatoxine, 4-Aminobiphenyl, Vinylchlorid).¹ Solche Untersuchungen sind allerdings zeitaufwendig, teuer, arbeitsintensiv und sicher nicht in jedem Fall ethisch zu rechtfertigen. Für die Bewertung des Gesundheitsrisikos besonders wichtiger Chemikalien sind solche Bioassays zur Zeit jedoch unverzichtbar.

Als Alternative stehen heute die sogenannten 'short term tests' zur Verfügung, die ohne großen Aufwand innerhalb kurzer Zeit (Tage, Wochen) Aussagen über das genotoxische Potential eines Stoffes liefern. Die Mutagenitätstests erfassen Gen-, Chromosomen- oder Genomveränderungen, während bei Indikatortests andere Effekte nachgewiesen werden (z.B. DNA-Reparatur), die häufig parallel zu Mutationen auftreten. Die zur Zeit bekannten Testmethoden lassen sich in 3 Gruppen zusammenfassen.

Tests an Mikroorganismen

- Prokaryonten (Bakterien)
- Eukaryonten (Hefen)

Tests an Warmblüterzellen

- DNA-Repareffekte
- Genmutationen
- Cytogenetische Effekte
- Transformationstests

Test am Tier

- Insekten
- Nagetiere

Trotz der Effizienz mancher Testsysteme ist es bisher nicht möglich, durch Anwendung eines Tests allein sichere Aussagen über die Kanzerogenität am Menschen zu machen.

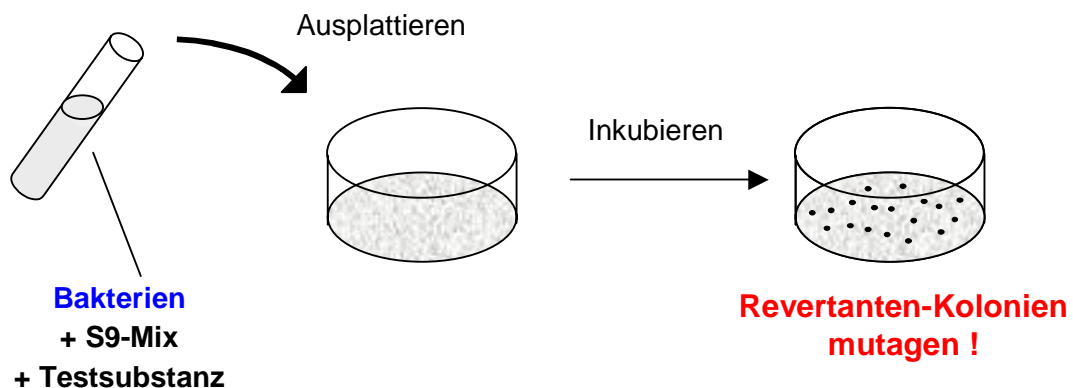
Ein besonders wichtiger bakteriologischer Kurzzeittest zur Bestimmung des mutagenen Potentials von Chemikalien wurde von Ames Mitte der siebziger Jahre entwickelt.⁵⁹ Der Ames-Test ist heute neben anderen Methoden in Forschung und Industrie als toxikologisches Standardverfahren etabliert⁶⁰ und bildet die experimentelle Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Mutagenitätsuntersuchungen. Der Ames-Test wurde mit der Zielvorstellung entwickelt, durch Bestimmung der mutagenen Wirkung in Bakterien Voraussagen über die kanzerogene Wirkung bei Mensch oder Tier machen zu können. Bei Substanzgruppen, die gegenüber der DNA reaktiv sind und beispielsweise als Elektrophile mit ihr Addukte bilden, zeigt sich eine besonders gute Übereinstimmung. In einem solchen Fall werden kanzerogene und nicht kanzerogene Stoffe mit einer Genauigkeit von ca. neunzig Prozent identifiziert⁶¹. Zu dieser Gruppe gehören neben den direkten Kanzerogenen auch alle Verbindungen, die im Körper zu Nitreniumionen metabolisiert werden können. Tatsächlich belegen Vergleichsstudien eine sehr gute Korrelation zwischen Mutagenität und Kanzerogenität bei aromatischen Aminen und Nitroaromaten. Werden also bei Struktur-Mutagenitäts-Untersuchungen Effekte gefunden, die zu einer Verringerung der Mutagenität führen, sind diese Effekte mit hoher Wahrscheinlichkeit auch geeignet, das kanzerogene Potential zu senken.

C Der Mutagenitätstest nach Ames

C.1 Grundlagen

Der Ames-Test beruht auf der quantitativen Bestimmung von Rückmutationen bei genetisch veränderten Stämmen von *Salmonella typhimurium*, die nicht in der Lage sind, Histidin zu synthetisieren (Histidin-Mangelmutanten). Durch bestimmte Basensubstitutions- oder Leserastermutationen (je nach eingesetztem Stamm, siehe Tabelle 5) können diese wieder zum Wildtyp revertieren. Da nur die Revertanten (der Wildtyp) auf Nährböden ohne Histidin überleben und zu sichtbaren Kolonien heranwachsen, kann ihre Anzahl durch einfaches Auszählen bestimmt werden (Abb. 13). Unter normalen Bedingungen finden auch ohne Zusatz einer Testsubstanz einige solcher Rückmutationen statt, die zur Bildung von Spontanrevertanten führen. Wird eine Substanz zugesetzt, die selbst Mutationen induziert, entstehen zusätzlich weitere Revertanten, deren Anzahl ein Maß für die Mutagenität darstellt.

Abb. 13: Verlauf des Ames-Tests



Der Ames-Test wurde bewußt so konstruiert, daß er genotoxische Effekte hochsensitiv nachweist. Die meisten verwendeten Bakterienstämme (TA-Stämme) enthalten neben den veränderten Genabschnitten des Histidin-Operons noch Deletionen im DNA-Reparatursystem (uvrB-Gen), so daß die Bakterien nicht mehr in der Lage sind, induzierte fehlerhafte DNA-Bereiche auszubessern, und damit die Empfindlichkeit gegenüber mutagenen Substanzen steigt. In einige Stämme hat man außerdem das Plasmid pKM101 eingebaut, das neben Genen für die Ampicillin-Resistenz ein besonders anfälliges Reparatursystem (SOS-Repair) enthält und die Empfindlichkeit weiter erhöht. Eine rfa-Mutation (deep rough factor) bedingt einen partiellen Verlust der Lipopolysaccharid-Barriere auf der Bakterienzellwand, so daß ihre

Permeabilität erhöht ist und größere Moleküleⁱ leichter ins Zellinnere gelangen können.⁶² Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Genotypen der TA-Stämme, die Ames für allgemeine Mutations-Tests empfiehlt.⁶³ Die meisten Untersuchungen wurden mit TA98 und TA100 durchgeführt.

Tabelle 5: Empfohlene Teststämme

Teststamm	Mutationsort	Mutationstyp	Zellwand	Reparatur	Plasmid
TA100	hisG46	Basensubstitution	rfa	Δ uvrB	pKM101
TA102	hisG428	ochre – Mutation	rfa	+	pKM101
TA97	hisD6610	Leseraster	rfa	Δ uvrB	pKM101
TA98	hisD3052	Leseraster	rfa	Δ uvrB	pKM101
TA1535	hisG46	Basensubstitution	rfa	Δ uvrB	-
TA1538	hisD3052	Leseraster	rfa	Δ uvrB	-

Naturgemäß ist der Metabolismus höherer Lebewesen sehr viel komplexer als bei *Salmonella typhimurium*, das beispielsweise zwar Enzyme für die O-Acetylierung (OAT) besitzt, nicht aber für die O-Sulfatierung oder N,O-Transacetylierung.⁶⁴ Da in Bakterien also bestimmte und vielleicht die entscheidenden mutationsauslösenden Metaboliten gar nicht gebildet werden, sind die Ergebnisse solcher Tests (insbesondere, wenn sie negativ sind) nur unter Vorbehalt auf die Mutagenität in Säugetieren oder dem Menschen übertragbar. Eine entscheidende Verbesserung des Ames-Test besteht darin, die fehlende Metabolisierungsmöglichkeiten durch Zugabe eines Aktivierungssystems (S9-Fraktion, ein Gemisch verschiedener Aktivierungsenzyme), das man aus homogenisierter Rattenleber gewinnt, zu simulieren. Um möglichst hohe Enzymkonzentrationen zu erhalten, wird den Ratten vorher ein Gemisch polychlorierter Biphenyle injiziert, die eine Induktion der Enzyme bewirken. Durch Zusatz von verschiedenen Co-Faktoren (z.B. Glukose-6-phosphat) zur S9-Fraktion erhält man den sogenannten S9-Mix.ⁱⁱ Man ermittelt die Mutagenität der Testsubstanzen normalerweise getrennt mit und ohne S9-Mix.

Bei aromatischen Aminen unterscheiden sich die Mutagenitätsraten erfahrungsgemäß mit und ohne S9-Mix sehr stark. Die Bakterienstämme enthalten von Natur aus wenig leistungsfähige Monooxygenasen, so daß kaum Oxidationen zum Hydroxylamin stattfinden und die Revertantenanzahl dementsprechend gering ist. Der S9-Mix liefert solche Monooxygenasen.

ⁱ Benzo[a]pyren z. B. kann normale Zellwände schlecht durchdringen.

ⁱⁱ Je nach Substanz, die zur Enzyminduktion verwendet wurde, können sich S9-Fraktionen in ihrer Aktivität stark unterscheiden.

tantenzahl dementsprechend gering ist. Der S9-Mix liefert solche Monooxygenasen. Es wird verstärkt Hydroxylamin gebildet werden und die Mutagenität nimmt stark zu. Bei Nitroaromaten ist die Mutagenität dagegen nicht an den Zusatz des Säugetieraktivierungssystems gebunden. Die *Salmonella*-Teststämme verfügen nämlich über wirkungsvolle Nitroreduktasen und ermöglichen damit die entscheidende Umwandlung zum Hydroxylamin auch ohne S9-Mix.ⁱ

C.2 Spezialstämme

Die Aussagekraft des Ames-Test wurde in den letzten Jahren durch die Entwicklung einer Reihe neuer Bakterienstämme, bei denen spezielle Enzyme ausgeschaltet oder ergänzt wurden, wesentlich erweitert. Solche Systeme erlauben es, die Bedeutung der entsprechenden Metabolisierungsschritte, und damit den Aktivierungsmechanismus für einzelne Testsubstanzen, zu untersuchen. Eine Auswahl findet sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: Spezialstämme zur Untersuchung der Aktivierungswege

Teststamm	Beschreibung	Referenz
TA100NR	wie TA100, aber Nitroreduktase ausgeschaltet	Rosenkranz ⁶⁵
TA100/1.8-DNP	wie TA100, aber OAT ausgeschaltet	McCoy ⁶⁶
YG1026	wie TA100, aber Nitroreduktase überexprimiert	Watanabe ⁶⁷
YG1029	wie TA100, aber OAT überexprimiert	Watanabe ⁶⁸
TA98NR	wie TA98, aber Nitroreduktase ausgeschaltet	Rosenkranz ⁶⁵
TA98/1.8-DNP ₆	wie TA98, aber OAT ausgeschaltet	Rosenkranz ⁶⁵
YG1021	wie TA98, aber Nitroreduktase überexprimiert	Watanabe ⁶⁷
YG1024	wie TA98, aber OAT überexprimiert	Watanabe ⁶⁸
YG7125	wie TA1535, aber OAT deletiert	Espinosa-Aguirre ⁶⁴
YG7129	wie TA1538, aber OTA deletiert	Espinosa-Aguirre ⁶⁴
TA1538/AOR	wie TA1538, zusätzlich CYP1A2, NADPH-P450	Kamataki ⁶⁹

Durch den S9-Mix werden Testsubstanzen wie Amine vor Eintritt in die Zelle metabolisiert. Statt der stabilen Testsubstanzen müssen die reaktiven und häufig sehr instabilen Metaboliten durch die Bakterienwand zur DNA wandern. Bei TA1538/AOR findet durch den Einbau der Oxidoreduktase die Aktivierung innerhalb des Bakteriums statt und die Empfindlichkeit für Amine, insbesondere für heteroaromatische, wird stark erhöht. Mittlerweile hat man ausgehend von TA100 auch neue Stämme kon-

ⁱ In der Literatur werden Nitroaromaten, die im Ames-Test ohne S9 aktiv sind, häufig als direkte Mutagene bezeichnet. In Sinne der exakten Definition ist das falsch, da nur die Nitrosoverbindungen und die aktivierten Hydroxylamine bzw. Hydroxamsäuren elektrophile Eigenschaften haben.

struiert, mit denen die Mutationsspezifität bestimmt werden kann.⁷⁰ Hieraus kann man ableiten, welche Basen durch das ultimale Kanzerogen angegriffen und welche Art von Basensubstitutionsmutationen durch die Mutagene induziert werden. Solche Untersuchungen sind wesentlich einfacher durchzuführen als die klassischen Methodenⁱ zur Adduktanalyse. Im Vergleich zu den Standard-Teststämmen TA98 und TA100 und einigen ihrer Varianten (TA98NR, TA98/1.8DNP₆) hat man die neuen Spezialstämme bisher nur in relativ wenigen Untersuchungen verwendet und Vergleiche sind dementsprechend kaum möglich. Ein Überblick der jüngsten Fortschritte bei der Entwicklung neuer Ames-Stämme stammt von Josephy.⁷¹

In dieser Arbeit wurden die Standard-Teststämmen TA100 und TA98 mit und ohne metabolische Aktivierung verwendet. Einige Substanzen wurden auch mit TA98NR untersucht.

C.3 Durchführung

Um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zu gewährleisten, hat Ames eine standardisierte Arbeitsvorschrift entwickelt, die im folgenden kurz skizziert ist.

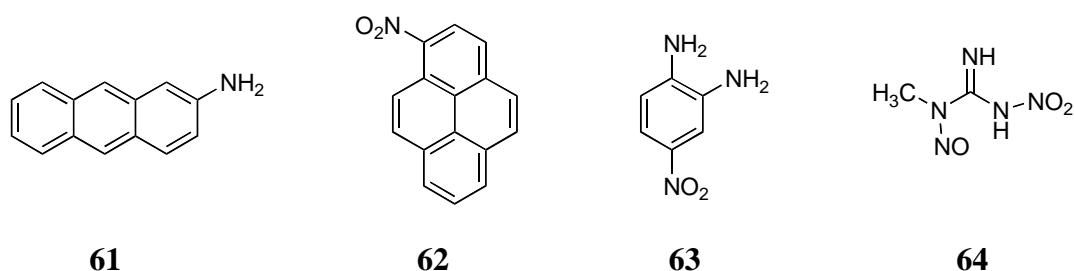
Die Histidin-bedürftigen Bakterienstämme (his-) werden für einige Stunden in einer Nährlösung bis zu einer bestimmten Zelldichte gezüchtet ($\sim 10^8$ Zellen). Ein Aliquot der Bakterienlösung vermischt man mit einer Lösung der zu untersuchenden Substanz (1 - 5000 μg) in DMSO oder einem anderen Lösungsmittel,ⁱⁱ setzt gegebenenfalls das metabolisierende System (S9-Mix) zu, verteilt diese Mischung auf Agarplatten mit einem Selektivnährboden (Minimal-Glucose-Agarplatten) und inkubiert. Die geringen Mengen des im Agar vorhandenen Histidins erlauben allen Bakterien einige Zellteilungen, während derer die Mutationen stattfinden können. Ein Teil dieser Mutationen bewirkt die Reversion in den Wildtyp (his+). Ist schließlich alles Histidin verbraucht, wachsen innerhalb von zwei Tagen nur noch die revertierten Bakterien (his+) zu deutlich sichtbaren Kolonien heran, die ausgezählt werden.

Zur Bestimmung der Spontanrevertanzahl dient eine Negativkontrolle, bei der nur Lösungsmittel ohne Testsubstanz zugesetzt wird (Lösungsmittel-Kontrollwert). Die Kolonien, die nach Abzug der Spontanrevertanzahl übrigbleiben, zeigen die zusätzlichen, durch den Teststoff induzierten Mutationen an. Um die Funktionalität des Testsystems und des S9-Zusatzes zu verifizieren, werden außerdem Positivkontrollen durchgeführt, bei denen statt der Testsubstanz bekannte, stark mutagene Verbindungen zugesetzt werden. Üblich ist die Verwendung von 2-Aminoanthracen (2-AA) **61**, 1-Nitropyren (1-NP) **62**, 4-Nitro-*ortho*-phenylendiamin (NOPD) **63**, Natriumazid oder N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) **64** (Abb. 14).

ⁱ z.B. ³²P-Labeling

ⁱⁱ z.B. THF

Abb. 14: Substanzen für die Positivkontrolle



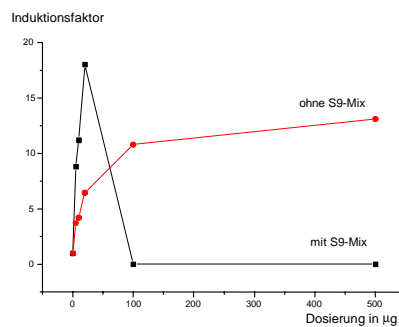
Da der Ames-Test als biologisches Verfahren immer eine gewisse Variabilität zeigt, wird jede Probe dreifach bestimmt und die mittlere Revertantenzahl errechnet. Trotz Standardisierung und Mittelwertbildung treten in Ames-Labors im Verlauf von Monaten immer wieder Schwankungen auf. So schwankt auch die Zahl der Spontanrevertanten: bei TA98 normalerweise zwischen 30 und 50 und bei TA100 zwischen 120 - 170, z.T. treten aber auch stärkere Abweichungen auf. Zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung wird der Test bei verschiedenen Substanzkonzentrationen durchgeführt.

Eine Substanz gilt als mutagen, wenn man mit steigender Konzentration eine reproduzierbare, konzentrationsabhängige Zunahme der Revertantenzahlen beobachtet und die Revertantenzahl das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwerts überschreitet.

C.4 Cytotoxische Reaktionen

Nur im Idealfall ist die Beziehung zwischen Dosis und induzierter Revertantenzahl über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich linear. Häufig reagieren die Testsubstanz oder ihre Metaboliten in höheren Konzentrationen cytotoxisch, so daß ein Teil der Bakterien abstirbt. Da die Mutationszahl direkt mit der Anzahl der lebenden Bakterien korreliert ist, entstehen im Vergleich zu einer nicht toxisch wirkenden Substanz mit der gleichen Mutagenität weniger Revertantenkolonien. Es wird also eine geringere Mutagenität vorgetäuscht. Im Falle hoher Cytotoxizität sterben schließlich alle Revertanten ab. Cytotoxischen Reaktionen müssen daher bei der Interpretation der Meßergebnisse immer mitberücksichtigt werden. In der Regel tritt bei geringen Testkonzentrationen die Cytotoxizität deutlich hinter die Genotoxizität zurück, so daß dieser Konzentrationsbereich zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung genutzt werden kann. In Abb. 15 ist eine typische Dosis-Wirkungs-Beziehung dargestellt.

Abb. 15: Dosis-Wirkungs-Beziehung



Wie der unterschiedliche Kurvenverlauf mit und ohne S9-Mix belegt, wird offensichtlich auch die Cytotoxizität durch den S9-Mix beeinflusst. Nur bei niedrigen Konzentrationen kann die Cytotoxizität vernachlässigt werden und der Mutagenitätsanstieg erfolgt näherungsweise linear. Bei den hohen Dosierungen überwiegt dagegen die Cytotoxizität und die Revertantenzahlen nehmen stark ab oder fallen sogar auf Null.

C.5 Bewertung und Vergleichbarkeit der Testergebnisse

Die Ergebnisse des Ames-Tests werden von vielen Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören neben der Reinheit der Testsubstanz, Abweichungen von dem Standard-Protokoll (Zeitangaben, Zusammensetzung der Puffer, Präinkubation, etc.), die Qualität des verwendeten Agars, aber auch die Konzentration, Zusammensetzung und Aktivität des S9-Mixes. Eine Vergleichbarkeit mit publizierten Daten ist daher nicht in jedem Fall gegeben. Schlußfolgerungen, die auf Ames-Daten aus verschiedenen Laboren basieren, sind daher nur unter Vorbehalt möglich, besonders dann, wenn exakte Angaben über das Testprotokoll fehlen.

Um eine hohe Vergleichbarkeit aller Mutationsergebnisse dieser Arbeit zu gewährleisten, wurde der Ames-Test für alle Substanzen im *selben* Labor unter *denselben* Bedingungen (Material, Durchführung) von *denselben* Mitarbeitern nach dem Standard-Protokoll durchgeführt. Verbindungen einer Testserie, in der bestimmte Strukturfaktoren nur in kleinen Schritten verändert wurden, wurden zudem – wenn möglich – immer im direkten Vergleich zueinander getestet.

Da der Ames-Test ursprünglich nur zur Beurteilung diente, ob eine Substanz mutagen ist oder nicht, und erst seit einigen Jahren auch quantitative Struktur-Mutagenitäts-Untersuchungen durchgeführt werden, haben sich neben den Vorschlägen von Ames (1983) eine Anzahl weiterer Methoden zur Quantifizierung des mutagenen Potentials entwickelt. In den meisten älteren Arbeiten wurden die Struktur-Wirkungs-Kurven einfach nur nebeneinander dargestellt und graphisch verglichen. Wesentlich objektiver ist die Berechnung des mutagenen Potentials

nach einer Regressionsanalyse über den linearen Bereich der Dosis-Wirkungs-Kurve. Das mutagene Potential ergibt sich dann aus der Steigung der Regressionsgerade und sollte in Revertanten/nmol Testsubstanz angegeben werden.ⁱ Eine genaue Grenze, ab der eine Verbindung als mutagen beurteilt werden muß, wird durch dieses Verfahren nicht definiert, da die entsprechenden Werte von der Konzentration der Bakterien, der Anzahl der Spontanrevertanten und dem betrachteten Teststamm abhängt. Diese Methode hat sich in den letzten Jahren in der Literatur weitgehend etabliert und wurde auch in dieser Arbeit angewendet.

Neben den Revertanten selbst werden üblicherweise auch sogenannte Induktionsfaktoren (IF) angegeben, die eine Beurteilung der Mutagenität einer Verbindung unabhängig von den Schwankungen bei den Spontanrevertanten erlauben. Die Induktionsfaktoren für die jeweiligen Konzentrationen werden ermittelt, indem man die Revertanzahlen durch den Lösungsmittelkontrollwert dividiert. Der Negativkontrolle (Spontanrevertanzahl) wird also der Induktionsfaktor 1 zugeordnet. **Werden Induktionsfaktoren von 2 oder mehr erreicht, gilt die Substanz als mutagen.** Auch hier ist ein direkter Vergleich der Induktionsfaktoren nur im linearen Bereich sinnvoll.

ⁱ Ames empfiehlt zwar die Angabe in Revertanten/ μg Testsubstanz, aus chemischer Sicht ist die Umrechnung in Revertanten/nmol Testsubstanz sinnvoller. Häufig wird das mutagene Potential auch als $\log(\text{Rev/nmol})$ angegeben.

D Struktur-Mutagenitäts Beziehungen

D.1 Überblick

Seitdem sich einfache Genotoxizitätstests wie der Ames-Test etabliert haben, wurde das mutagene Potential von vielen tausend Verbindungen bestimmt. Entsprechend ihrer großen Bedeutung wurden und werden aromatische Amine und Nitroverbindungen besonders ausführlich untersucht, so daß mittlerweile umfangreiches Datenmaterial über die Mutagenität dieser Stoffe zur Verfügung steht.

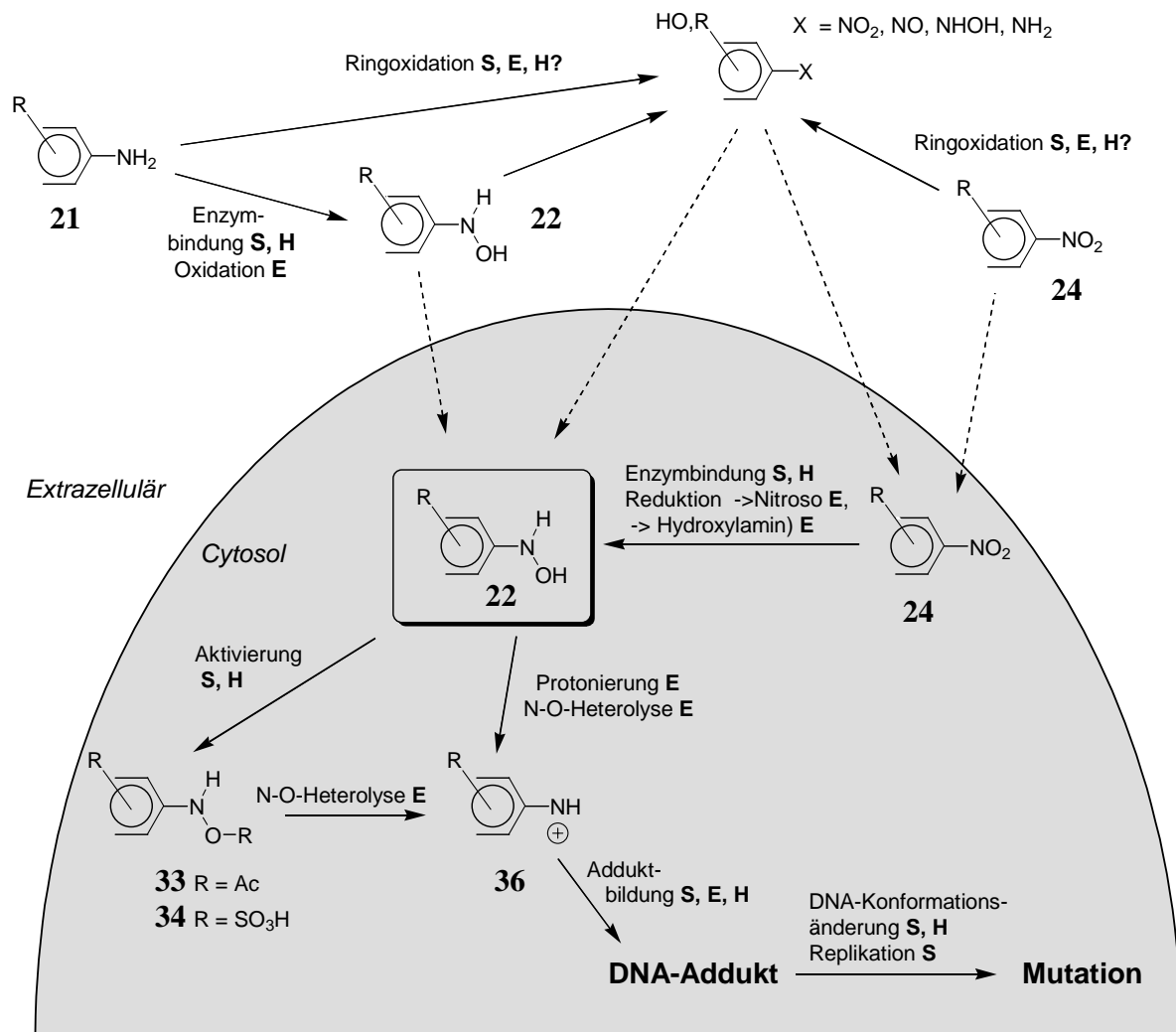
Wie in den vorausgegangenen Kapiteln dargestellt, ist die Schädigung der DNA und die Induktion von Mutationen im Detail ein äußerst komplexer Vorgang, der sich aus vielen Teilschritten – Transportprozessen, enzymkatalysierten Redoxreaktionen, Konjugationen, Adduktbildung, etc. – zusammensetzt. Veränderungen der Struktur eines Mutagens und damit seiner elektronischen, sterischen und physikochemischen Eigenschaften können grundsätzlich jeden der Teilschritte beeinflussen. In Abb. 16 ist zusammengestellt, welche Effekte bei den wichtigsten Schritten der Mutagenese durch aromatische Amine und Nitroverbindungen in *Salmonella typhimurium* bei zugesetztem S9-Mix eine Rolle spielen könnten.ⁱ

Wie wirken sich diese Einflüsse aber konkret auf die Mutagenität aus? Welche Strukturänderungen begünstigen ein hohes mutagenes Potential, welche erniedrigen es? Tatsächlich ist der Einfluß von Strukturfaktoren bisher nur für ganz wenige Teilschritte untersucht worden. Aufgrund chemischer Überlegungen lassen sich entsprechende Effekte teilweise jedoch abschätzen.

Dabei darf man nicht vergessen, daß trotz aller Gemeinsamkeiten der Mutagenese (metabolische Zwischenstufen und Adduktbildung) Amino- und Nitroaromaten nicht völlig analog behandelt werden können. Abgesehen von den zum Teil gegensätzlichen elektronischen Einflüssen gerade bei der Aktivierung (vgl. D.3.1), ergibt sich ein wichtiger Unterschied aus dem speziellen Aufbau des Ames-Tests. Amine werden durch den S9-Mix extrazellulär oxidiert, d.h. das elektrophile Hydroxylamin muß nach seiner Bildung noch die Zellwand passieren und wird erst dann durch Veresterung weiteraktiviert. Bei den Nitroaromaten findet die Aktivierung dagegen erst nach Eintritt in die Zelle im Cytosol statt.

ⁱ Die N-Acetylierung und ihre Folgereaktionen sind hier nicht explizit aufgeführt.

Abb. 16: Einfluß der Hydrophobie (**H**) sowie von elektronischen (**E**) und sterischen (**S**) Faktoren auf die Mutagenese



Wenn es gelingt, eine genotoxische Verbindung so zu modifizieren, daß wichtige Teilschritte der Mutagenese nicht mehr ablaufen können, verliert diese Verbindung damit auch ihre mutagenen/kanzerogenen Eigenschaften.

D.2 Klassifizierung

Bereits seit Anfang der achtziger Jahre gibt es intensive Bemühungen, die allgemeinen Beziehungen zwischen Struktur und Mutagenität (Structure Activity Relationship, SAR) bei Aminen und Nitroverbindungen aufzuklären. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sollen diese Untersuchungen hier grob in zwei Kategorien, nämlich die qualitativen und die quantitativen Studien (QSAR), unterteilt werden.

In vielen Arbeiten steht allein die Beschreibung von neuen Mutagenitätsuntersuchungen und auffälligen Einzelergebnissen im Vordergrund. Solche Untersuchungen tragen dazu bei, neue

mutagene Verbindungsklassen zu entdecken, die Mechanismen der Mutagenese weiter aufzuklären und die spezifischen Struktureigenschaften, die einen Stoff zu einem Mutagen machen, besser zu verstehen.⁷² In der Regel werden dabei nur wenige (10 - 15) Verbindungen getestet, die chemisch ähnlich sind. Innerhalb dieser kleinen Datensätze können dann einzelne Struktureffekte, die bei größeren Datensätzen gar nicht ins Gewicht fallen würden, erkannt, untersucht und gegebenenfalls qualitativ mit der Mutagenität korreliert werden. Fraglich bleibt dabei immer, ob die entdeckten Korrelationen allgemeine Bedeutung haben oder innerhalb der kleinen Datensätze nur zufällig auftreten. Wirklich von Nutzen ist eine Korrelation erst dann, wenn die Bedeutung eines Effekts an möglichst vielen Beispielen verifiziert worden ist und der Effekt auch erklärt werden kann.

In den letzten Jahren haben daneben quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR) große Aufmerksamkeit erregt. Hier werden quantitative Beziehungen zwischen der Mutagenität und Parametern gesucht, die durch die Struktur bestimmt werden.ⁱ Verwendet man sehr große, strukturell vielfältige Datensätze, lassen sich mit dieser Methode allgemeingültige Faktoren und die Stärke ihres Einflusses auf die Mutagenität ermitteln. Mit dieser Methode können auch Faktoren erkannt werden, die sich vergleichsweise langsam mit der Struktur ändern und daher in kleinen Datensätzen nicht auffallen. Durch Korrelationsanalyse zwischen dem mutagenem Potential von Amino- und Nitroaromaten und ihren elektronischen sowie physikochemischen Eigenschaften konnten mittlerweile eine Reihe empirischer Gleichungen aufgestellt werden, die die entsprechenden Beziehungen mathematisch beschreiben. Ein entscheidender Fortschritt dieser QSAR-Gleichungen besteht darin, daß sie neben der Analyse der wichtigsten Zusammenhänge auch die Vorhersage der Mutagenität ermöglichen. Werden beispielsweise in die entsprechenden Gleichungen nur Parameter integriert, die allein aufgrund der Struktur theoretisch berechenbar sind, kann man auf diese Weise das Risikopotential auch von bisher nicht getesteten oder unbekannten Stoffen abschätzen.

Erfolgreiche Gleichungen zur Vorhersage der Mutagenität müssen möglichst alle strukturellen Aspekte einer Verbindung berücksichtigen, die sich aus beiden Ansätzen ergeben.

D.3 Wichtige Strukturfaktoren für die Mutagenität

Im folgenden soll der Einfluß von elektronischen, physikochemischen (Löslichkeit, Hydrophobie) und sterischen Faktoren etwas genauer beleuchtet werden. Da durch strukturelle Ver-

ⁱ z.B. Parameter, die ohne größeren Aufwand berechnet oder experimentell gemessen werden können, wie die Hydrophobie, Orbitalenergien, Bildungsenthalpien, Reduktionspotentiale, etc.

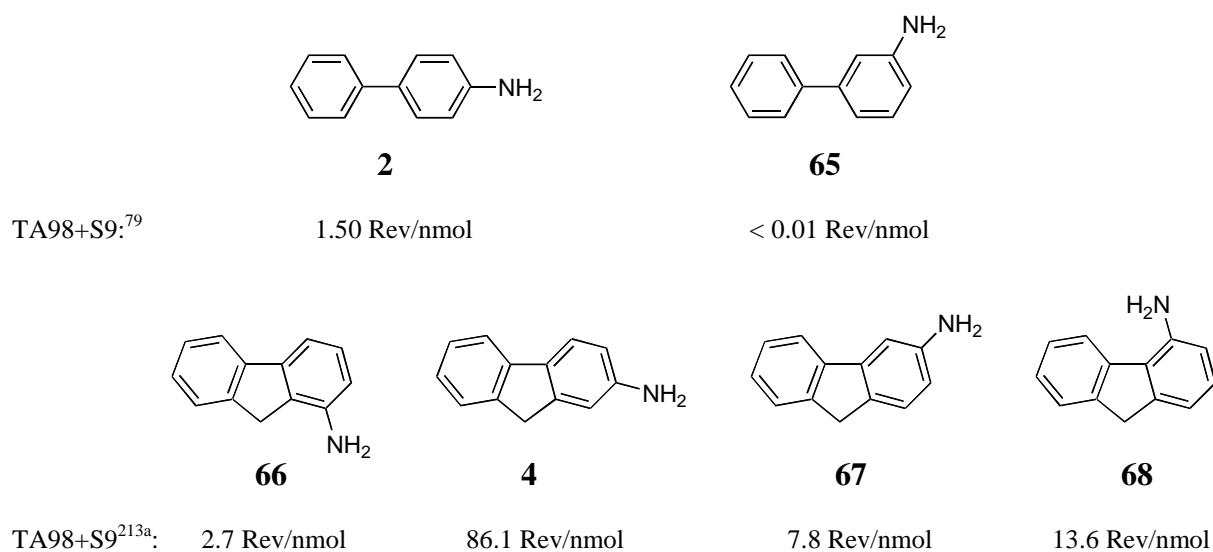
änderungen des aromatischen Gerüsts häufig gleich mehrere Eigenschaften parallel zueinander verändert werden, ist eine exakte Trennung der einzelnen Faktoren jedoch nicht immer möglich.

D.3.1 Stabilität der Nitreniumionen / Elektronische Faktoren

Nach Abb. 16 beeinflussen elektronische Faktoren die oxidative und reduktive Aktivierung, die N-O-Heterolyse der aktivierten Hydroxylamine (protoniert oder verestert) und die Stabilität der Nitreniumionen. Im Hinblick auf die metabolische Aktivierung sollte man erwarten, daß sich Veränderungen der Elektronendichte je nach betrachteter Verbindungsklasse unterschiedlich auswirken. Die N-Hydroxylierung von Aminen (z.B. Amin **21** → Hydroxylamin **22**) erfolgt schließlich leichter an elektronenreichen Systemen, bei denen die Basizität des Stickstoffs höher ist. Die reduktive Aktivierung der Nitroaromaten (Nitro **24** → Nitroso **23** → Hydroxylamin **22**) ist dagegen bei elektronenarmen Systemen bevorzugt.

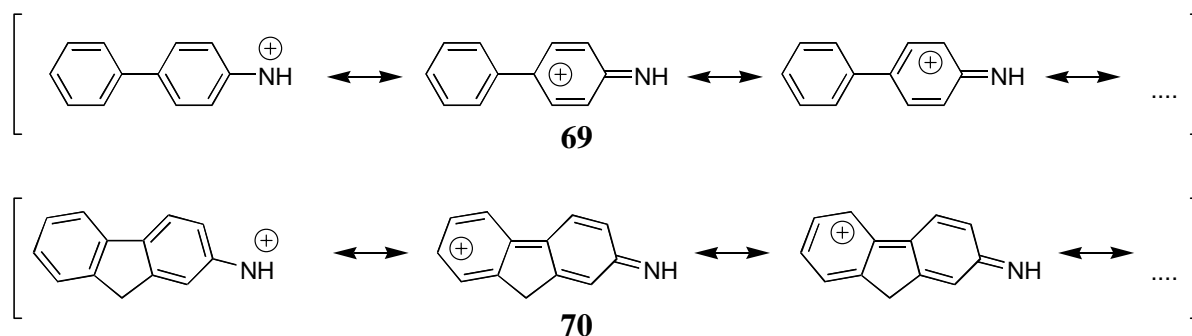
Die Reaktivität von Hydroxylaminen und deren O-acetylierten Derivaten wurde von Meier, George⁷³ und Kutscher⁷⁴ aus unserem Arbeitskreis näher untersucht. Sie konnten unter anderem zeigen, daß donorsubstituierte O-acetylierte Hydroxylamine deutlich instabiler als ihre Analoga mit Akzeptorsubstituenten sind und bei *in vitro* Reaktionen mit DNA höhere Aduktausbeuten ergeben. Nach Studien von Wild und Dirr ist für die Mutagenese von Aminen aber weder die oxidative Aktivierung noch die N-O-Heterolyse entscheidend, sondern vor allem die Effizienz der Reaktion des Nitreniumions mit der DNA.⁷⁵ Novak hat gezeigt, daß die Lebensdauer von Nitreniumionen (z.B. von 4-Aminobiphenyl) grundsätzlich hoch genug ist, um mit DNA-Basen reagieren zu können.⁷⁶ Die Stabilität der Nitreniumionen und ihre Lebensdauer wird vor allem von zwei Faktoren beeinflusst, nämlich durch Mesomerie (Delokalisierung der positiven Ladung) und durch die elektronischen Verhältnisse am aromatischen Gerüst.^{77,81,82} Die Möglichkeit zur Mesomeriestabilisierung ist dabei von der Position der Aminogruppe abhängig. So fiel schon kurz nach Veröffentlichung der ersten Reihenuntersuchungen auf, daß die Mutagenität bei N-substituierten Aromaten häufig dann besonders hoch ist, wenn die funktionelle Gruppe entlang der längsten Achse des Grundkörpers sitzt und so eine optimale Konjugation mit dem Aromaten erlaubt. Dieses Phänomen tritt beispielsweise bei den stellungsisomeren Aminobiphenylen^{78,79}, Aminonaphthalinen⁷⁸, Aminocarbazolen, Aminofluorenen^{213a} und vielen anderen polycyclischen Aminoaromaten⁸⁰ auf.

Abb. 17: Einfluß der Position der funktionellen Gruppe auf die Mutagenität



Die intermediär auftretenden Nitreniumionen **69** und **70** von 4-Aminobiphenyl **2** bzw. 2-Aminofluoren **4** können durch Konjugation gut stabilisiert werden und haben somit eine ausreichend hohe Lebensdauer, um zur DNA zu gelangen und mit ihr zu reagieren. Bei den Nitreniumionen der anderen Isomere ist eine so aufgeprägte Konjugation nicht möglich und es wird eine geringere (**66**, **67**, **68**) bzw. im Falle des 3-Aminobiphenyls **65** gar keine Mutagenität beobachtet.

Abb. 18: Mesomeriestabilisierung von Nitreniumionen

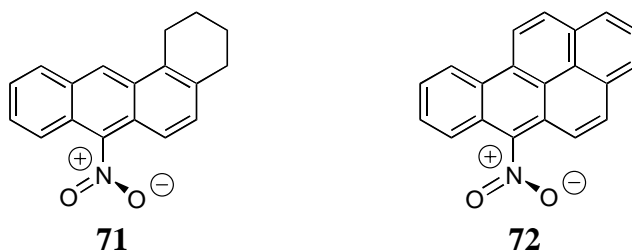


Wie erwähnt, hängt die Lebensdauer von Nitreniumionen aber auch von der Elektronendichte ab. Ren hat anhand von substituierten Biphenylen gezeigt, daß Nitreniumionen von elektronenreichen Aromaten (+I-, +M-Substituenten) generell stabiler als die von elektronenarmen sind (-I-, -M-Substituenten).⁸¹ Bestätigt und erweitert wurden diese Ergebnisse durch Rechnungen von Bube.⁸²

Die Aktivität von Nitroaromaten im Ames-Test wird ebenfalls von der Position der Nitrogruppe beeinflusst. Auch bei den isomeren Nitrobiphenylen^{79,118}, Nitronaphthalinen¹¹⁸, Nitro-

carbazolen, Nitrochalconen⁸³ und vielen anderen nitrosubstituierten polycyclische Aromaten ist in der Regel dasjenige Stellungsisomer, das eine optimale Mesomeriestabilisierung des entsprechenden Nitreniumions erlaubt, am stärksten mutagen. Daneben spielt die Konformation der Nitrogruppe relativ zum aromatischen System eine wichtige Rolle. Nach Vance⁸⁴ und Fu⁸⁵ sind Verbindungen wie 7-Nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenz[a]anthracen **71** oder 6-Nitrobenzo[a]pyren **72** mit Nitrogruppen, die aus sterischen Gründen senkrecht zur aromatischen Ebene stehen, kaum oder gar nicht mutagen in TA98 und TA100.

Abb. 19: Einfluß der NO₂-Orientierung auf die Mutagenität



TA98-S9:

< 1 Rev/nmol

< 1 Rev/nmol

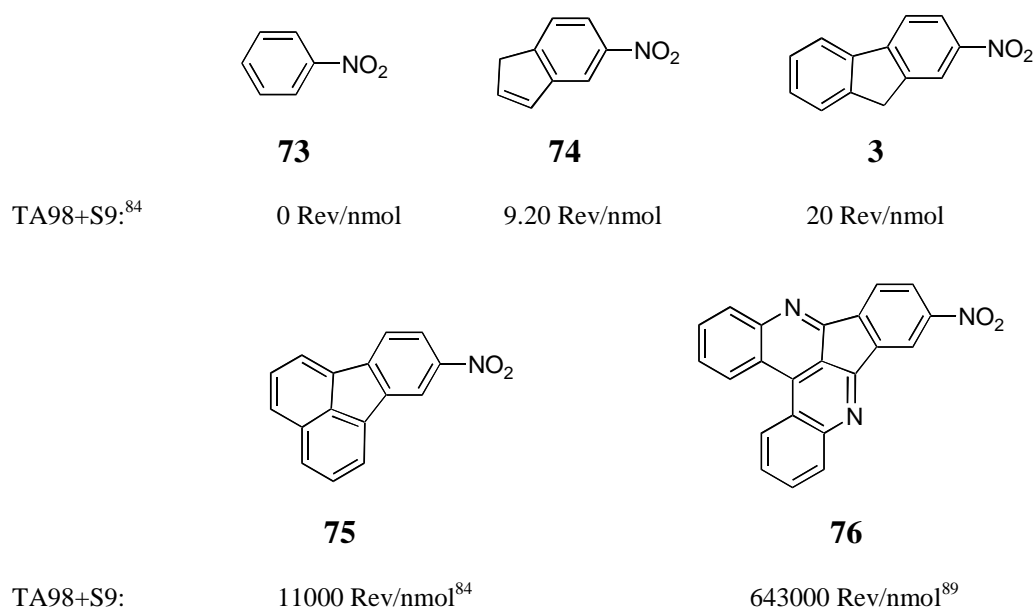
Insgesamt wichtiger scheint bei Nitroaromaten aber der elektronische Einfluß auf die reduktive Aktivierung zu sein. Studien von Klopman,⁸⁶ Loew,⁸⁷ und Compardre¹¹¹ haben gezeigt, daß die Mutagenität von aromatischen Nitroverbindungen zumindest teilweise mit den Energien der niedrigsten unbesetzten Molekülorbitale (LUMO) korreliert ist. Die Mutagenität nimmt generell zu, je niedriger die LUMOs liegen und je elektronenärmer der Aromat ist. Ein ähnlicher Zusammenhang gilt auch für die experimentellen Halbwellen-Reduktionspotentiale. Entgegen den Untersuchungen von Klopman, der für einige Verbindungen dieser Substanzklasse eine lineare Beziehung zwischen den ersten Halbwellen-Reduktionspotentialen und dem Logarithmus der Mutagenität aufzeigte,⁸⁶ scheinen die Verhältnisse nach neueren Ergebnissen von Jung aber komplizierter zu sein.^{85d}

D.3.2 Hydrophobie

In den späten achtziger Jahren ist erkannt worden, daß die Hydrophobie einen ganz entscheidenden Einfluß auf das Risikopotential chemischer Kanzerogene⁸⁸ hat. Die Hydrophobie als physikochemischer Parameter ergibt sich direkt aus der Struktur einer Verbindung. Sie nimmt mit der Größe des Kohlenstoffskeletts oder durch Einführung von Alkyl-, Aryl- oder Halogenresten zu, durch Einführung von Carboxy-, Hydroxy-, Amino- oder Nitrogruppen dagegen ab. Tatsächlich wird die Aktivität eines Stoffes durch die Größe des aromatischen Grundgerüst sehr stark beeinflusst.⁸⁴ Dies gilt für aromatische und heteroaromatische Amine und Nitroverbindungen. So steigt

die Mutagenität im allgemeinen mit der Anzahl der kondensierten Ringe stark an (**73** < **74** < **3** < **75** < **76**), wobei dieser Effekt in TA98 in der Regel stärker ausgeprägt ist als bei TA100. Die höchste Mutagenität wird bei kompakten Systemen mit einer Ringanzahl von 4-5 beobachtet (z.B. 1,8-Dinitropyren, 4 Ringe, TA98-S9: 245000 Rev/nmol) fällt aber für noch größere Systeme meist wieder deutlich ab (z.B. 1-Nitrocoronen, 7-Ringe, TA98-S9: 2.81 Rev/nmol). Das heteroaromatische 11-Nitro-9,14-diazadibenz[*a,e*]acephenanthren **76** mit 6 kondensierten Ringen gilt im Moment als das stärkste bekannte Mutagen überhaupt.

Abb. 20: Einfluß der Größe des aromatischen Ringgerüsts auf die Mutagenität (TA98)



Die Zunahme der Mutagenität im Ames-Test mit steigender Hydrophobie ist mittlerweile auch durch QSAR-Studien belegt worden (vgl. Abschnitt D.4).

Nach Abb. 16 kommen für die mutagenitätssteigernde Wirkung der Hydrophobie mehrere Ursachen in Frage. So werden Verbindungen mit log P-Werten zwischen 1 und 6 mit zunehmender Hydrophobie leichter durch Zellmembranen (hier *Salmonella typhimurium*) transportiert.ⁱ Andererseits sind hydrophobe Wechselwirkungen häufig auch für die Bindung an Enzyme und damit für die Geschwindigkeit der Aktivierung von großer Bedeutung. Durch *in vitro* Untersuchungen an Pyrazolen, Alkylbenzolen, chlorierten Biphenylen, 4-Nitrophenylalkylethern, etc. wurde beispielsweise gezeigt, daß die Bindung an CYP-450-Oxidationssysteme stark mit der Hydrophobie des Substrats zunimmt.⁹⁰ Ganz ähnliche Zusammenhänge

ⁱ Stoffe mit sehr niedriger (log P < 1) oder sehr hoher (log P > 6) Hydrophobie können Bakterienwände schlechter durchdringen.

gelten auch für die Induktionⁱ dieser Enzyme *in vivo*. Eine typische Beziehung gibt die Gleichung

$$\log I = 0.28(\pm 0.06) \text{ CLOGP} - 1.80(\pm 0.23) \quad (2)$$

wieder, wobei $\log I$ die Induktionsrate von CYP1A2 (nmol/Min./mg Protein) in Rattenleber und CLOGP den $\log P$ -Wert, berechnet mit dem CLOG-Programm von Leo⁹¹, bezeichnet.

Auch für Phase II Reaktionen wurden QSAR-Gleichungen entwickelt, die belegen, daß beispielsweise die Glucuronidierung, die Sulfatierung oder die Konjugation mit Glycin linear oder bilinear mit der Hydrophobie korreliert sind.

Experimentell kann der $\log P$ -Wert einer Verbindung durch seine Verteilung zwischen Octanol und Wasser ermittelt werden. Heute gibt es aber auch eine Reihe theoretischen Methoden zur Bestimmung von $\log P$ -Werten. Nach dem bekanntesten Ansatz wird das Molekül dazu in Fragmente unterteilt. Jedem dieser Fragmente wird eine empirisch bestimmte Hydrophiliekonstante zugeordnet und aus deren Summe der entgeltige $\log P$ -Wert ermittelt. Nach diesem Prinzip arbeitet auch das Programm KOWWIN, das in dieser Arbeit verwendet worden ist, um $\log P$ -Werte zu berechnen.

D.3.3 Sterische Faktoren

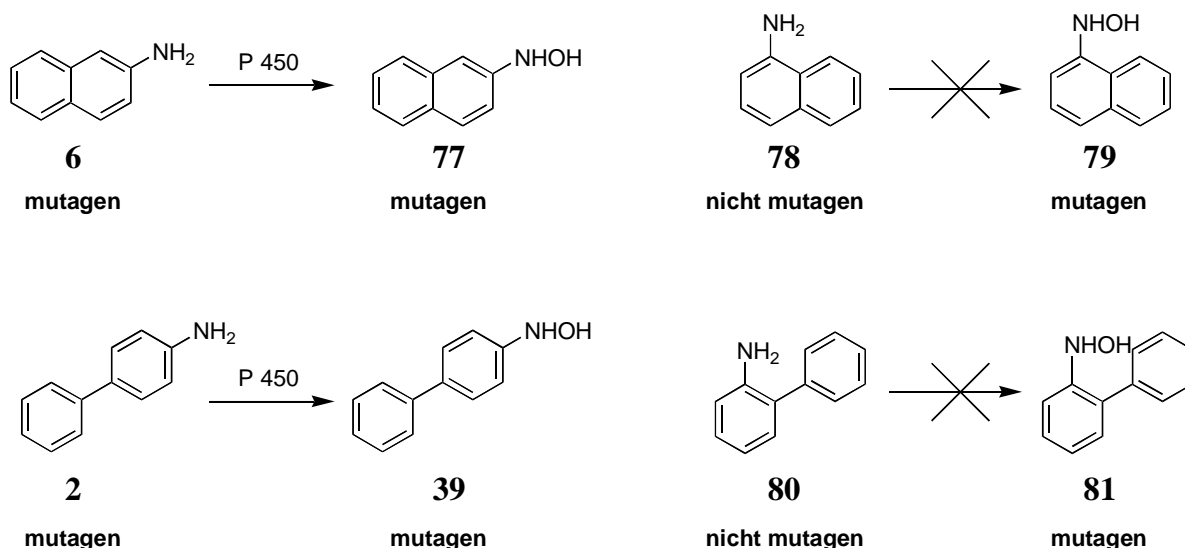
Sterische Effekte sind generell bei Prozessen, an denen Markomoleküle (Enzyme, DNA) beteiligt sind, von großer Bedeutung. Dies sollte insbesondere dann gelten, wenn sich sterisch anspruchsvolle Reste nahe am Reaktionszentrum befinden und dieses vom Reaktionspartner abschirmen. Im Hinblick auf die Mutagenese scheinen sterische Wechselwirkungen beispielsweise bei der oxidativen Aktivierung von Aminen eine Rolle zu spielen (Abb. 21).^{92,93}

So sind 2-Naphthylamin **6** und 4-Aminobiphenyl **2** im Ames-Test stark mutagen, während 1-Naphthylamin **78** und 2-Aminobiphenyl **80** inaktiv sind. Nach Studien von Gorrod läßt sich dieses Phänomen auf Unterschiede im Metabolismus zurückzuführen.⁹² Während 2-Naphthylamin **6** und 4-Aminobiphenyl **2** durch Enzymkatalyse (CYP 450) leicht zu den entsprechenden Hydroxylaminen **77** bzw. **39** oxidiert werden, findet dieser Prozeß weder beim 1-Naphthylamin **78** noch beim 2-Aminobiphenyl **80** statt.ⁱ Die enzymatische N-Hydroxylierung ist bei diesen Substraten also nicht möglich.⁹³ Nach Meinung der Autoren sind hierfür ungünstige sterische Wechselwirkungen des Enzyms (CYP 450) mit dem *peri*-Wasserstoff (1-Naphthylamin **78**) oder mit der *ortho*-Phenylgruppe (2-Aminobiphenyl **80**) verantwortlich.⁹⁴ Die

ⁱ Bindung und Induktion sind miteinander korreliert.

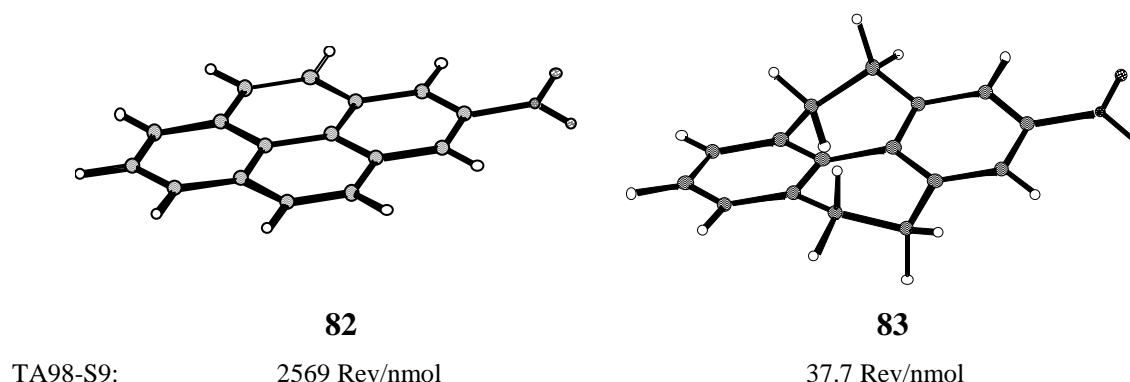
chemisch synthetisierten Hydroxylamine **79** und **81** sind dagegen genau wie **77** und **39** potente Mutagene. Offensichtlich sind die Folgeschritte - also die Veresterung der OH-Gruppe und die Reaktion mit der DNA - gegenüber sterischen Faktoren weit weniger anfällig.

Abb. 21: Ursachen für Inaktivität von 1-Naphthylamin und 2-Aminobiphenyl



Ein anderes Strukturmerkmal, das qualitativ mit dem mutagenen Potential korreliert worden ist und am ehesten als sterisches Phänomen gedeutet werden kann, ist das Ausmaß an Aromatizität eines Stoffes und die damit einhergehende Planarität. Nach Hirayama ist 2-Nitropyren **82** in TA98 deutlich aktiver als in TA100 und wirkt somit primär als Frameshift-Mutagen.⁹⁵

Abb. 22: Einfluß der Planarität auf die Mutagenität (TA98)ⁱⁱ



Durch schrittweise Hydrierung der seitlichen Doppelbindungen zu 2-Nitro-4,5-dihydropyren und weiter zu 2-Nitro-4,5,9,10-tetrahydropyren **83** geht die Planarität und gleichzeitig auch

ⁱ Hier kommt es nur zur Ringoxidation.

ⁱⁱ Die Geometrie der Strukturen wurde mit Chem3D durch das AM1-Verfahren optimiert.

die Mutagenität stark zurück.ⁱ 2-Nitro-4,5,9,10-tetrahydropyren **83**, das eine in sich verdrehte Struktur hat, ist von diesen Verbindungen am wenigsten aktiv.⁹⁵ Die Planaritätsabnahme reduziert die Fähigkeit, als Frameshift-Mutagen zu wirken, ganz offensichtlich.

Die Quantifizierung von sterischen Effekten bei Verbindungen wie 1-Naphthylamin **78** und 2-Naphthylamin **5** oder 2-Nitro-4,5,9,10-tetrahydropyren **83** und 2-Nitropyren **82**, bei denen der sterische Anspruch eng mit der Form/Gestalt des Grundgerüsts zusammenhängt, ist generell ein schwieriges Problem, das in der Regel nicht durch simple Einführung von Parametern gelöst werden kann. Einfacher ist die Behandlung von sterischen Effekten, die durch zusätzliche Substituenten verursacht werden. Von den verschiedenen in der Literatur beschriebenen Ansätzen (z.B. Verwendung des molaren Volumens oder des Brechungsindex als sterische Parameter) soll hier nur das Modell von Taft zur Definition des sterischen Parameters E_s kurz erläutert werden.⁹⁶ Dieses basiert auf den kinetischen Daten der Hydrolyse bzw. der Bildung von substituierten Essigsäureestern (XCH_2COOR). Taft postulierte, daß der Einfluß des Substituenten X auf die Geschwindigkeit der säurekatalysierten Esterhydrolyse bzw. Esterbildung allein sterischer Natur ist. Der sterische Parameter E_s kann demnach definiert werden als:

$$E_s = \log (k_x / k_h)_A \quad (3)$$

wobei k_x die Geschwindigkeitskonstante für die säurekatalysierte Hydrolyse von XCH_2COOR und k_H die Geschwindigkeitskonstante für die Hydrolyse des unsubstituierten Essigsäureesters CH_3COOR bezeichnet. Obwohl die Annahme, daß elektronische und Resonanzeffekte bei der sauren Hydrolyse vernachlässigt werden können, von einigen Autoren kritisiert worden ist und verschiedene Methoden zur Korrektur von E_s vorgeschlagen wurden, sind E_s -Werte in zahlreichen QSAR-Studien erfolgreich angewendet worden. Auch in dieser Arbeit spielen sie eine wichtige Rolle. Durch umfangreiche experimentelle Studien und theoretische Modelle zur Berechnung von E_s stehen E_s -Werte für sehr viele Substituenten zur Verfügung.⁹⁶

Eine wesentlich neuere Methode zur Erfassung sterischer Wechselwirkungen besteht in der Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA).⁹⁶

ⁱ Die abnehmende Aromatizität wirkt sich wahrscheinlich auch auf die Stabilität der Nitreniumionen aus. Wie groß dieser Effekt ist und ob auch er zur Mutagenitätsabnahme beiträgt, ist nicht bekannt.

D.4 Wichtige QSAR-Gleichungen

Für die Entwicklung von QSAR-Gleichungen über die Mutagenität von Amino- und Nitroaromaten sind physikochemische ($\log P$), elektronische Parameter (HOMO-, LUMO-Energien, Bildungsenthalpienⁱ) und eine Reihe spezieller Strukturfaktoren, wie z.B. die Anzahl der konjugierten Ringe oder die Größe des aromatischen Systems, herangezogen worden.^{97,98}

Die große Bedeutung der Hydrophobie spiegelt sich auch in den QSAR-Studien wider. Auf Grundlage eines Datensatzes von 19 Aminen und Amiden konnte Trif Beziehung für die Mutagenität in TA98 und TA100 in Abhängigkeit von der Hydrophobie (als $\log P$), der Position der Aminogruppe und der Anwesenheit einer Acetylgruppe am Stickstoff aufstellen.ⁱⁱ Das wichtigste Ergebnis dieser Korrelation war, daß die Mutagenität linear mit der Hydrophobie anstieg.⁹⁹ Durch Acetylierung der Aminogruppe wurde die Mutagenität dagegen reduziert, wahrscheinlich deswegen, weil die Acetylgruppe erst abgespalten werden muß, bevor es zur N-Hydroxylierung kommt. Hatch gelang es unter Verwendung eines wesentlich größeren Datensatzes aus 66 aromatischen und 99 heteroaromatischen Aminen, die Mutagenität in TA98 mit der Größe des aromatischen Systems zu korrelieren, wobei diese allerdings nicht über die Hydrophobie, sondern über die Anzahl der kondensierten Ringe gemessen wurde.¹⁰⁰ Aufgrund des hohen Anteils heteroaromatischer Verbindungen mußten aber noch andere Faktoren, wie z.B. die Anzahl der Ring-Heteroatome, miteinbezogen werden.ⁱⁱⁱ

Ford publizierte zwei QSAR-Studien, die die Schlüsselrolle von Nitreniumionen bei der Mutagenese im Ames-Test belegen.^{101,102} Er konnte die relativen Bildungsenergien $\Delta\Delta H_f$ sowohl von aromatischen als auch von heteroaromatischen Nitreniumionen mit den mutagenen Potentialen der entsprechenden Amine korrelieren. Die Mutagenität ist dabei jeweils über den Logarithmus der Revertanten pro nmol Testsubstanz definiert. $\log TA98$ dient hierbei als Abkürzung für $\log(\text{Revertanten}_{TA98}/\text{nmol})$.

ⁱ Die Bildungsenthalpie ist ein thermodynamischer Parameter, der aber im wesentlichen von den elektronischen Verhältnissen bestimmt wird.

ⁱⁱ Die entsprechenden Gleichungen lauten für TA98: $\log(1+\text{Rev}/\text{nmol}) = -1.639(\pm 0.399) + [0.816(\pm 0.127)] \log P - [0.752(\pm 0.174)]I_1 + [0.377(\pm 0.174)]I_2$ und für TA100 $\log(1+\text{Rev}/\text{nmol}) = -1.559(\pm 0.282) + [0.784(\pm 0.090)] \log P - [0.735(\pm 0.123)]I_1 + [0.496(\pm 0.123)]I_2$, wobei I_1 die Position der Aminogruppe wiedergibt (1 = neben einem Gerüstknotenpunkt gebunden; 0 entfernt von einem Gerüstknotenpunkt) und I_2 bezeichnet, ob die Aminogruppe acetyliert ist (0) oder nicht (1).

ⁱⁱⁱ Die Gleichung lautet: $\log(\text{Rev}/\text{nmol}) = 1.52 \text{ Fus} + 1.19 \text{ NMe} + 0.31 \text{ Het} - 3.11$, mit Fus = Anzahl der kondensierten Ringe, NMe = Anwesenheit (1) oder Abwesenheit (0) eines Methylsubstituenten am Ringstickstoff und Het = Anzahl der Ringheteroatome. Neben der Größe des Aromaten ist also wichtig, ob methylierte Ringstickstoffe vorliegen oder nicht. Die N-methylierten Verbindungen sind deutlich stärker mutagen. Außerdem nimmt die Mutagenität mit der Anzahl der Ringheteroatome zu.

So gelten für aromatische Amine die Gleichungen:¹⁰¹

$$\log \text{TA98} = -[0.273(\pm 0.009)]\Delta\Delta H_f - 2.798(\pm 0.131) \quad n = 6, s = 0.052, R = 0.999 \quad (4)$$

$$\log \text{TA100} = -[0.144(\pm 0.037)]\Delta\Delta H_f - 0.710(\pm 0.550) \quad n = 6, s = 0.219, R = 0.940 \quad (5)$$

und für heteroaromatische Amine die Gleichungen:¹⁰²

$$\log \text{TA98} = -[0.181(\pm 0.043)]\Delta\Delta H_f + 0.227(\pm 0.279) \quad n = 14, s = 0.966, R = 0.770 \quad (6)$$

$$\log \text{TA100} = -[0.147(\pm 0.024)]\Delta\Delta H_f - 0.162(\pm 0.450) \quad n = 13, s = 0.540, R = 0.877 \quad (7)$$

wobei n die Anzahl der berücksichtigten Testsubstanzen, s die Standardabweichung und R den Korrelationskoeffizient bezeichnet.ⁱ Verbindungen, die stabile Nitreniumionen bilden (hohe negative Bildungsenthalpie $\Delta\Delta H_f$), sind demnach mutagener als solche, die weniger stabile Nitreniumionen bilden. Der verwendete Datensatz ist allerdings vergleichsweise klein. Korrelationsstudien von Sabbioni und Wild ergaben ein ganz ähnliches Bild.¹⁰³ Zusätzlich zur Stabilität der Nitreniumionen wurden in ihren Korrelationsgleichungen aber noch LUMO-Energien und die Ladung am Stickstoff berücksichtigt.

Die bisher umfangreichsten Analysen wurden von Debnath und Hansch durchgeführt, die sowohl für Nitroaromaten und aromatische Amine Korrelationsgleichungen für TA98 und TA100 entwickelten. Wie bei Ford erfolgte die Quantifizierung des mutagenen Potentials als $\log(\text{Rev}/\text{nmol})$. Die entsprechenden Gleichungen für die Amine lauten:¹⁰⁴

$$\begin{aligned} \log \text{TA98} = & 1.08(\pm 0.26)\log P + 1.28(\pm 0.64)E_{\text{HOMO}} \\ & - 0.73(\pm 0.41)E_{\text{LUMO}} + 1.46 I_1 - 7.20(\pm 5.4) \quad n = 88, s = 0.860, R = 0.898 \quad (8) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log \text{TA100} = & 0.92(\pm 0.23)\log P + 1.17(\pm 0.83)E_{\text{HOMO}} \\ & - 1.18(\pm 0.44)E_{\text{LUMO}} + 7.35(\pm 6.9) \quad n = 67, s = 0.708, R = 0.877 \quad (9) \end{aligned}$$

Auch nach dieser Studie wird die Mutagenität hauptsächlich durch die Hydrophobie bestimmt. In TA100 sind allein mit der Hydrophobie 60% der mutagenen Varianz erklärbar. Die Abhängigkeit der Mutagenität von der Hydrophobie ist in Abb. 23 graphisch dargestellt. In TA98 ist daneben die Indikatorvariable I_1 wichtig, die eingeführt wurde, um die hohe Mutagenität von großen polycyclischen Aromaten zu berücksichtigen. Für Substanzen mit drei oder mehr kondensierten aromatischen Ringen (z.B. 2-Aminofluoren) gilt $I_1 = 1$, während für

ⁱ Als Maß für die Güte einer Korrelation dienen der Korrelationskoeffizient R , bzw sein Quadrat R^2 und die Standardabweichung s . Werte für R zwischen 0.7 und 1 belegen eine enge Korrelation, die umso besser ist, je höher der Koeffizient ist; die Standardabweichung sollte dagegen möglichst niedrig sein.

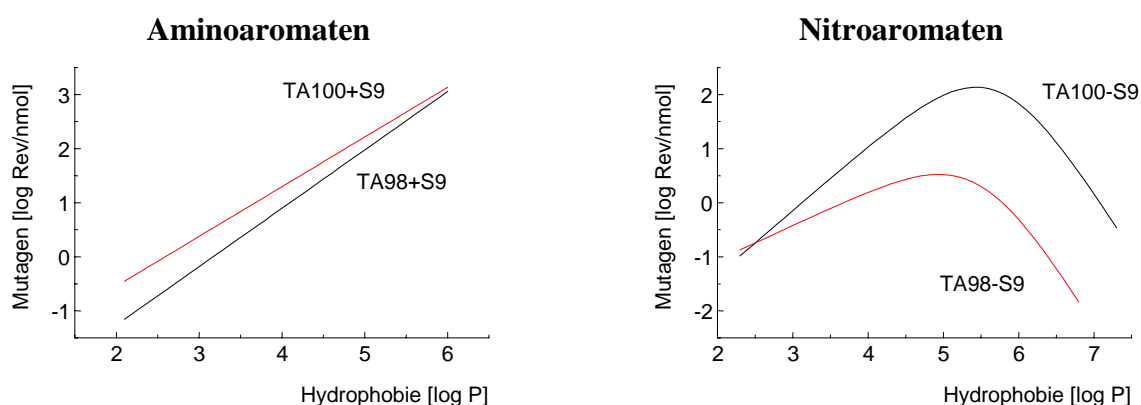
alle anderen Substanzen $I_1 = 0$ gesetzt wird. Elektronische Faktoren sind nach dieser Analyse für die Mutagenität nur von relativ geringer Bedeutung, da sich die gegenläufige Faktoren (oxidative Aktivierung \Leftrightarrow Stabilisierung der Nitreniumionen) ausgleichen.

Für die entsprechende QSAR-Analyse der Mutagenität bei Nitroaromaten wurden fast zweihundert aromatische und heteroaromatische Verbindungen miteinbezogen.^{105,106} Die Gleichungen für die Nitroverbindungen lauten:ⁱ

$$\begin{aligned} \log \text{TA98} &= 0.65(\pm 0.16) \log P - 2.90(\pm 0.59) \log (\beta 10^{\log P} + 1) \\ &\quad - 1.38(\pm 0.25) E_{\text{LUMO}} + 1.88 I_1 - 4.15(\pm 0.17) \quad n = 188, s = 0.886, R = 0.900 \text{ (10)} \\ &\quad \log \beta = -5.48 \\ \log \text{TA100} &= 1.20(\pm 0.15) \log P - 3.40 (\pm 0.74) \log (\beta 10^{\log P} + 1) \\ &\quad - 2.05(\pm 0.32) E_{\text{LUMO}} - 6.39(\pm 0.23) \quad n = 117, s = 0.835, R = 0.886 \text{ (11)} \\ &\quad \log \beta = -5.70 \end{aligned}$$

Bei den Nitroaromaten hat die Hydrophobie ebenfalls den größten Einfluß auf das mutagene Potential. Im Unterschied zu den bisher vorgestellten QSAR-Gleichungen für Amine zeigt die Aktivität der Nitroaromaten in beiden Stämmen aber eine bilineare Abhängigkeit von $\log P$ (Abb. 23). Die Mutagenität steigt mit zunehmender Hydrophobie linear an, allerdings nur solange, bis sie einen optimalen $\log P$ -Wertⁱⁱ erreicht, um dann wieder linear abzufallen. Der optimale $\log P$ -Wert liegt für TA98 bei 4.93 und für TA100 bei 5.44.

Abb. 23: Abhängigkeit der Mutagenität von der Hydrophobie nach Gleichung 8, 9, 10 und 11



Eine genaue Ursache für den starken Abfall der Mutagenität bei höheren $\log P$ -Werten geben Debnath und Hansch nicht: *"The rapid drop in activity may be due to a combination of ad-*

ⁱ Die Originalgleichungen enthalten noch zusätzliche Indikatorvariablen, die der Übersichtlichkeit halber weggelassen wurden. Diese Indikatorvariablen berücksichtigen spezielle Verbindungsklassen, die hier keine Rolle spielen. β ist eine Konstante.

ⁱⁱ Optimal bedeutet hier, daß die Mutagenität bei diesem Wert am höchsten ist.

verse hydrophobic and steric effects". Sie vermuten aber, daß bei sehr großen Molekülen wie beispielsweise 1-Nitrocoronen ungünstige sterische Wechselwirkungen mit den Aktivierungsenzymen oder mit der DNA eine Rolle spielen. Ähnlich wie bei den Aminen wird mit der Indikatorvariable I_1 die besonders hohe Mutagenität von polykondensierten Nitroaromaten in TA98 erfaßt. Im Hinblick auf elektronische Faktoren ist Mutagenität dagegen einfach linear mit der Energie des LUMOs korreliert. Genau wie bei der Hydrophobie ist dieser Effekt in beiden Stämmen nahezu identisch. Verbindungen mit tiefliegenden LUMOs werden leichter zum Hydroxylamin reduziert. Die QSAR-Gleichungen belegen daher, daß nicht etwa die Stabilität der Nitreniumionen, sondern die Nitroreduktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Mutagenese von Nitroaromaten ist.

Die Bedeutung der Hydrophobie und der Molekülorbitalenergien für die Mutagenität ist auch an einem anderen Bakterium nachgewiesen worden. So haben Debnath und Hansch die Wirkung von 15 Nitroaromaten auf die Mutagenität in einem speziellen Stamm von *Escherichia coli* untersucht. Dabei wurde eine QSAR-Gleichung gefunden, die eine starke Ähnlichkeit zu der Gleichung für *Salmonella typhimurium* TA100 zeigte.¹⁰⁷

D.5 Substituenteneinflüsse

Die elektronischen, sterischen und physikochemischen Eigenschaften eines Stoffes werden primär durch die Struktur des Grundkörpers bestimmt. Abgesehen von der Modifikation des aromatischen Gerüsts können diese Eigenschaften aber auch durch Einführung von Substituenten in weiten Grenzen variiert werden. Obwohl man bereits eine Vielzahl substituierter Derivate von Amino- und Nitroaromaten in TA98 und TA100 getestet hat,ⁱ ist die Wirkung von Substituenten auf die Mutagenität nur in ganz wenigen Arbeiten systematisch untersucht worden. Auch in den QSAR-Analysen hat man vergleichsweise wenig substituierte Verbindungen berücksichtigt.

Detaillierte Mutagenitätsstudien wurden über substituierte Derivate einer Reihe industriell wichtiger Chemikalien wie z.B. von Anilin^{113,114} oder den isomeren Phenylendiaminen durchgeführt,^{72,108} die als Bestandteile von Haarfärbemitteln eingesetzt werden. Ein empirisches System zur Vorhersage der Mutagenität speziell von substituierten Anilinen und Phenylendiaminen auf Grundlage von Säurekonstanten, elektronischen und sterischen Konstantenⁱⁱ

ⁱ Bezogen auf substituierte Amino-/Nitroaromaten zeigt die Literaturrecherche, daß die meisten Ames-Tests bisher bei Derivaten mit zusätzlichen Amino-, Nitro-, Methyl-, Halogen- oder Hydroxysubstituenten durchgeführt wurden. Abgesehen von den QSAR-Gleichungen, gibt es kaum allgemeine Angaben darüber, ob sich diese Substituenten eher verstärkend oder verringern auf die Mutagenität auswirken.

ⁱⁱ Dabei wurden nur sterische Effekte von Substituenten in *ortho*-Position zur Aminogruppe berücksichtigt.

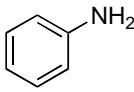
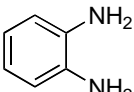
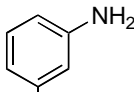
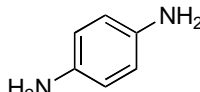
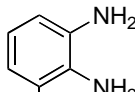
wurde von Kalopissis entwickelt.¹⁰⁹ Auch bei Benzidinen,^{115,116,191} die man zur Herstellung von Azofarbstoffen verwendet, bei den Azofarbstoffen selbst oder bei 4',4-Methylenbisanilinen,²⁰⁵ die in der Polyurethanherstellung eingesetzt werden, ist bekannt, daß Substituenten die Mutagenität stark beeinflussen. Im Hinblick auf Nitroaromaten hat Shimizu vergleichende Mutagenitätsdaten von etlichen Nitrobenzolderivaten publiziert.^{110,197} Bei vielen dieser Arbeiten handelt es sich allerdings um reine Auflistungen der Ames-Ergebnisse ohne genauere Analyse der einzelnen Effekte. Eine wesentlich weitergehende Studie an einem polycyclischen System stammt von Vance, der anhand von 7-substituierten 2-Nitrofluorenen unter anderem den Einfluß von Substituenten auf die Reduktion der Nitrogruppe und auf die Stabilisation des Hydroxylamins und des Nitreniumions untersucht hat.¹⁹⁵ Demnach führten elektronenziehende Substituenten (F, Cl, Br, I, NO, NO₂, CN) zu einer Erhöhung der Mutagenität in TA98, während elektronenschiebende Substituenten die Mutagenität verringerten. Compadre und Hansch zeigten in einer QSAR-Analyse, daß die Mutagenität der substituierten Nitrofluorene mit der Hydrophobie und der LUMO-Energie korreliert ist.¹¹¹ Ähnliche Zusammenhänge wurden von Sinsheimer berichtet, der bei Struktur-Mutagenitäts-Beziehungen von substituierten 4-Aminostilbenen und 4-Aminobiphenylen fand, daß die Mutagenität mit Hammett σ^+ -Werten bzw. LUMO-Energien und HPLC-Verteilungskoeffizienten korreliert ist.¹¹⁶ Systematische Studien bei anderen polycyclischen Systemen gibt es bisher nicht.ⁱ

Relativ unübersichtlich sind die Verhältnisse bei Verbindungen mit mehreren Amino- und/oder Nitrogruppen. In vielen Fällen nimmt die Mutagenität mit der Anzahl der Amino- oder Nitrogruppen proportional zu, so bei Amino- und Nitroderivaten von Benzol^{112,196}, bei Nitrobiphenylen⁷⁹, Nitrofluorenen¹⁹⁵, Nitropyrenen, etc..

Ein typisches Beispiel zeigt Abb. 24. Wahrscheinlich ist für die Mutagenitätszunahme die gleichzeitige Aktivierung mehrerer Amino- oder Nitrogruppen verantwortlich. Außerdem stabilisieren zusätzliche Aminogruppen (+M-Substituenten) die intermediär gebildeten Nitreniumionen.

ⁱ Eine Ursache dafür mag sein, daß substituierte Amino-/Nitroaromaten abgesehen von einigen Ausnahmen (Methyl, Hydroxy) als Umweltschadstoffe oder Pyrolyseprodukte bei der Nahrungszubereitung nur eine geringe Rolle spielen. Außerdem ist ihre Darstellung und Reinigung besonders bei polycyclischen Systemen relativ schwierig. Neuere Synthesemethoden, die den sukzessiven Aufbau solcher Aromaten erlauben, werden das Studium der Substituenteneffekte sicher erleichtern.

Abb. 24: Einfluß der Anzahl der Aminogruppen auf die Mutagenität

				
84	85	86	87	88
TA98+S9: ^{113,114} 0.03 Rev/nmol	2.13 Rev/nmol	1.30 Rev/nmol	3.37 Rev/nmol ⁱ	20.30 Rev/nmol

Interessanterweise kennt man gerade bei Aminen aber auch genau den umgekehrten Zusammenhang, also den Rückgang der Mutagenität mit der Anzahl der Aminogruppen. Benzidin ist deutlich weniger mutagen als 4-Aminobiphenyl (wie durch eine Reihe von Ames-Tests eindeutig belegt ist),^{79,115,116} 4',4-Diaminostilben ist weniger mutagen als 4-Aminostilben¹¹⁶ und 2,7-Diaminofluoren ist weniger aktiv als 2-Aminofluoren.¹⁹⁵ Die Ursache für dieses Phänomen ist bisher nicht endgültig geklärt. Abgesehen von der Anzahl der Amino- und Nitrogruppen ist auch ihre relative Stellung zueinander wichtig. Bei Nitroanilinen und Dinitrobenzolen sind beispielsweise die *ortho*-Verbindungen inaktiv, während die *meta*- und *para*-Isomere z.T. recht hohe Mutagenitäten aufweisen.¹⁹⁶

Ein grundsätzliches Problem bei der Untersuchung von Substituenteneffekten besteht darin, daß die Zusammenhänge schnell sehr komplex werden. So ändern sich mit einem zusätzlichen Substituenten die elektronischen, sterischen und physikochemischen Eigenschaften meist gleichzeitig. Eine genaue Zuordnung, welche Eigenschaftsänderung gegebenenfalls für eine Änderung der Mutagenität verantwortlich ist, kann nur durch Vergleichsstudien ermittelt werden, bei denen gezielt eine Eigenschaft variiert wird. Zudem werden einige Substituenten leicht metabolisch transformiert, besonders in Gegenwart des metabolischen Aktivierungssystems. Alkohole werden beispielsweise leicht oxidiert, acetyliert, sulfatiert, glucuronidiert oder auf andere Weise konjugiert (Phase II Reaktion), bei Ketonen sind Reduktionen zu Alkoholen oder andere typische Carbonylreaktionen denkbar, Acetale und Cyanide können hydrolysiert, Ether gespalten und Carbonsäuren verestert werden. Aufgrund der Vielfalt der Metabolisierungsmöglichkeiten ist im Einzelfall daher nicht immer zu entscheiden, welcher Metabolit für die mutagene Wirkung verantwortlich ist. Eine eindeutige Auswertung der Substituenteneffekte wird dadurch enorm erschwert.

ⁱ Die Mutagenität von 1,4-Diaminobenzol ist umstritten. Crebelli hat gereinigtes 1,4-Diaminobenzol als nicht mutagen beschrieben,¹⁰⁸ ebenso Kaiser.¹⁹⁶ Andere Autoren haben 1,4-Diaminobenzol als nicht mutagen, schwach mutagen oder mutagen eingestuft, wobei allerdings die Reinheit der getesteten Proben nicht angegeben wurde.¹¹³

D.6 *Modellsubstanzen zur Berücksichtigung sterischer Effekte*

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Entwicklung neuer allgemeingültiger Strategien zur Reduktion des mutagen Potentials von Amino- und Nitroaromaten. In den vorangegangenen Abschnitten wurden die grundlegenden Reaktionen der Mutagenese und die wichtigsten Faktoren, die die Mutagenität dieser Verbindungen bestimmen, dargestellt. Nach den QSAR-Analysen ist die Aktivität vor allem mit der Hydrophobie und elektronischen Faktoren korreliert. Sterische Faktoren spielen in diesen Gleichungen keine Rolle. Nach der Analyse aus Abschnitt D.3.3 können sterischen Effekte aber sehr wohl die Mutagenität verändern. Aus einer kürzlich veröffentlichten CoMFA-Studie von Fan geht zudem hervor, daß die Mutagenität von Nitroaromaten durch Erhöhung des Raumanspruchs rechtwinklig zur aromatischen Ebene abnehmen sollte.¹¹⁷

Weitgehend unerforscht war bisher, wie sich sterisch anspruchsvolle Substituenten auf die Mutagenität von Amino- und Nitroaromaten auswirken. Erste Mutagenitätsuntersuchungen aus unserem Arbeitskreis haben gezeigt, daß sperrige Alkylreste, wie z.B. *tert*-Butyl-Substituenten direkt neben der funktionellen Gruppe, die Mutagenität im Vergleich zum Grundkörper stark reduzieren können. Was geschieht aber, wenn zunehmend größer werdende Alkyl-, Alkoxy- oder Dialkylaminosubstituenten weit weg von der funktionellen Gruppe in einen mutagenen Grundkörper eingeführt werden, so daß deren Reaktivität nicht beeinflußt wird? Führt allein die Veränderung der Molekülform durch die zusätzlichen Substituenten zu einer Verringerung der Mutagenität? Können Substituenteneinflüsse durch Berücksichtigung von Hydrophobie und elektronischen Faktoren mit den QSAR-Gleichungen zuverlässig erfaßt werden? Auch Veränderungen an der funktionellen Gruppe selbst sollten einen starken Einfluß auf die Mutagenität haben. Welche Modifikationen führen zu besonders aktiven und welche zu schwach aktiven Verbindungen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche, hochreine Modellsubstanzen synthetisiert, im Ames-Test untersucht und die Ergebnisse analysiert. Dazu wurden z.T. auch Daten aus anderen Arbeiten herangezogen. In Tabelle 7 sind die durchgeführten Testreihen mit den entsprechenden Verbindungen dargestellt.

Im folgenden Kapitel ist die Herstellung dieser Verbindungen ausführlich beschrieben.

Tabelle 7: Übersicht der Modellsubstanzen

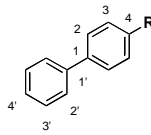
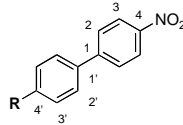
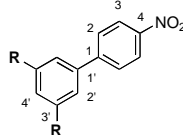
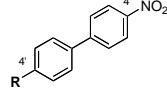
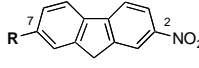
Testserie	Name	Abkürzung		Struktur	R
1-I	4-Nitrobiphenyl	4NBp	1		-NO ₂
	4-Aminobiphenyl	4ABp	2		-NH ₂
	4-Nitrosobiphenyl	4NOBp	89		-NO
	4-Hydroxylaminobiphenyl	4NHOHBp	90		-NHOH
	N,N-Dimethyl-4-aminobiphenyl	N,N-DiMe-4ABp	91		-NMe ₂
	N- <i>tert</i> -Butyl-4-aminobiphenyl	N- <i>t</i> Bu-4ABp	92		-NH <i>t</i> Bu
	N-Acetyl-4-aminobiphenyl	N-Ac-4ABp	93		-NHOAc
2-I	4-Nitrobiphenyl	4NBp	1		-H
	4'-Methyl-4-nitrobiphenyl	4'Me-4NBp	94		-Me
	4'-Ethyl-4-nitrobiphenyl	4'Et-4NBp	95		-Et
	4'- <i>iso</i> -Propyl-4-nitrobiphenyl	4' <i>i</i> Pr-4NBp	96		- <i>i</i> Pr
	4'- <i>tert</i> -Butyl-4-nitrobiphenyl	4' <i>t</i> Bu-4NBp	97		- <i>t</i> Bu
	4'- <i>n</i> -Butyl-4-nitrobiphenyl	4' <i>n</i> Bu-4NBp	98		- <i>n</i> Bu
2-II	3'-Methyl-4-nitrobiphenyl	3-Me-4NBp	99		-H/-Me
	3',5'-Dimethyl-4-nitrobiphenyl	3',5'DiMe-4NBp	100		-Me
	3',5'-Di- <i>tert</i> -butyl-4-nitrobiphenyl	3',5'Di <i>t</i> Bu-4NBp	101		- <i>t</i> Bu
2-III	4'-Adamantyl-4-nitrobiphenyl	4'Ad-4NBp	102		-Ad
	4-Nitroterphenylen	4NTp	103		-Ph
	2-Phenyl-5-nitropyridin	2Ph5NP	104		-H
	4'- <i>tert</i> -Butyl-2-phenyl-5-nitropyridin	4' <i>t</i> Bu-2Ph5NP	105		- <i>t</i> Bu
	2-Nitro-5-phenylpyridin	5Ph2NP	106		-H
	4'- <i>tert</i> -Butyl-2-nitro-5-phenylpyridin	4' <i>t</i> Bu-5Ph2NP	107		- <i>t</i> Bu
2-VI	2-Nitrofluoren	2NF	3		-H
	7-Methyl-2-nitrofluoren	7Me-2NF	108		-Me
	7- <i>tert</i> -Butyl-2-nitrofluoren	7 <i>t</i> Bu-2NF	109		- <i>t</i> Bu
	7-Adamantyl-2-nitrofluoren	7Ad-2NF	110		-Ad

Tabelle 7: Übersicht der Modellsubstanzen - Fortsetzung I

Testserie	Name	Abkürzung		Struktur	R
3-I	4-Aminobiphenyl	4ABp	2		-H
	4'-Methyl-4-aminobiphenyl	4'Me-4ABp	111		-Me
	3'-Methyl-4-aminobiphenyl	3'Me-4ABp	112		-Me
	3',5'-Dimethyl-4-aminobiphenyl	3',5'DiMe-4ABp	113		-Me/-Me
	4'-Ethyl-4-aminobiphenyl	4'Et-4ABp	114		-Et
	4'- <i>iso</i> -Propyl-4-aminobiphenyl	4' <i>i</i> Pr-4ABp	115		- <i>i</i> Pr
	4'- <i>tert</i> -Butyl-4-aminobiphenyl	4' <i>t</i> Bu-4ABp	116		- <i>t</i> Bu
3-II	2-Phenyl-5-aminopyridin	5Ph2AP	117		-H
	4'- <i>tert</i> -Butyl-2-phenyl-5-amino-pyridin	4' <i>t</i> Bu-5Ph2AP	118		- <i>t</i> Bu
3-III	2-Aminofluoren	2AF	4		-H
	7-Methyl-2-aminofluoren	7Me-2AF	119		-Me
	7- <i>tert</i> -Butyl-2-aminofluoren	7 <i>t</i> Bu-2AF	120		- <i>t</i> Bu
	7-Adamantyl-2-aminofluoren	7Ad-2AF	121		-Ad
4-I	4'-Hydroxymethyl-4-nitrobiphenyl	4'HOCH ₂ -4NBp	122		-CH ₂ OH
	4'-(1-Hydroxyethyl)-4-nitro-biphenyl.	4'(1HOEt)-4NBp	123		-CH(OH)CH ₃
	4'-Carboxy-4-nitrobiphenyl	4'HO ₂ C-4NBp	124		-COOH
	4'-Bromomethyl-4-nitrobiphenyl	4'BrCH ₂ -4NBp	125		-CH ₂ Br
5-I	4'-Trifluormethyl-4-nitrobiphenyl	4'CF ₃ -4NBp	126		-CF ₃
	3'-Trifluormethyl-4-nitrobiphenyl	3'CF ₃ -4NBp	127		-CF ₃
	3',5'-Ditrifluormethyl-4-nitro-biphenyl.	3',5'DiCF ₃ -4NBp	128		-CF ₃
	7-Trifluormethyl-2-nitrofluoren	7'CF ₃ -2NF	129		-CF ₃
5-II	4'-Trifluormethyl-4-aminobiphenyl	4'CF ₃ -4ABp	130		-CF ₃
	3'-Trifluormethyl-4-aminobiphenyl	3'CF ₃ -4ABp	131		-CF ₃
	3',5'-Ditrifluormethyl-4-amino-biphenyl	3',5'DiCF ₃ -4ABp	132		-CF ₃
	7-Trifluormethyl-2-aminofluoren	7'CF ₃ -2AF	133		-CF ₃

Tabelle 7: Übersicht der Modellsubstanzen - Fortsetzung II

Testserie	Name	Abkürzung		Struktur	R
6-I	4- <i>trans</i> -Nitrostilben	4NS	5		-H
	4'- <i>trans</i> -Methyl-4-nitrostilben	4'Me-4NS	134		-Me
	4'- <i>trans</i> -Ethyl-4-nitrostilben	4'Et-4NS	135		-Et
	4'- <i>trans-iso</i> -Propyl-4-nitrostilben	4'iPr-4NS	136		-iPr
	4'- <i>trans-tert</i> -Butyl-4-nitrostilben	4'tBu-4NS	137		-tBu
	4'- <i>trans-sec</i> -Butyl-4-nitrostilben	4'sBu-4NS	138		-sBu
7-I	4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl	4'HO-4NBp	139		-OH
	4'-Methoxy-4-nitrobiphenyl	4'MeO-4NBp	140		-OMe
	4'-Trifluormethylsulfonyloxy-4-nitrobiphenyl	4'CF ₃ SO ₃ -4NBp	141		-O ₃ SCF ₃
	4'-Phenylcarbonyloxy-4-nitrobiphenyl	4'PhCOO-4NBp	142		-OOCPh
	4'-Methoxy-2-phenyl-5-nitropyridin	4'MeO-2Ph5NP	143		-OMe
7-II	3'- <i>tert</i> -Butyl-4'-methoxy-4-nitrobiphenyl	3'tBu4'MeO-4NBp	144		-tBu/OMe
	4'-Methoxy-4-nitrobiphenyl	4'MeO-4NBp	140		-OMe
	4'-Ethoxy-4-nitrobiphenyl	4'EtO-4NBp	145		-OEt
	4'- <i>iso</i> -Propoxy-4-nitrobiphenyl	4'iPrO-4NBp	146		-OiPr
	4'- <i>tert</i> -Butoxy-4-nitrobiphenyl	4'tBuO-4NBp	147		-OtBu
	4'- <i>n</i> -Butoxy-4-nitrobiphenyl	4'nBuO-4NBp	148		-OnBu
	4'- <i>n</i> -Octoxy-4-nitrobiphenyl	4'nOctO-4NBp	149		-OnOct
	4-Adamantox-4-nitrobiphenyl	4'AdO-4NBp	150		-OAd
7-III	4'-Methoxy-4-aminobiphenyl	4'MeO-4ABp	151		-OMe
	4'- <i>tert</i> -Butoxy-4-aminobiphenyl	4'tBuO-4ABp	152		-OtBu
8-I	4-Nitrobiphenyl	4NBp	1		-H
	4'-Amino-4-nitrobiphenyl	4'NH ₂ -4NBp	153		-NH ₂
	N,N-Dimethyl-4'-amino-4-nitrobiphenyl	4'NMe ₂ -4NBp	154		-NMe ₂
	N,N-Diethyl-4'-amino-4-nitrobiphenyl	4'NEt ₂ -4NBp	155		-NEt ₂
	N,N-Di- <i>iso</i> -propyl-4'-amino-4-nitrobiphenyl	4'NiPr ₂ -4NBp	156		-NiPr ₂

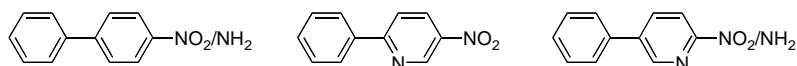
E Synthese der Modellsubstanzen

E.1 Forderungen an effiziente Synthesen

Zur Untersuchung von Struktur-Mutagenitäts-Beziehungen wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Derivate von 4-Nitro-/4-Aminobiphenyl, 2-Nitro-/2-Aminofluoren, 2-Phenyl-5-nitropyridin (2-Aza-4-nitrobiphenyl), 5-Phenyl-2-nitro-/2-aminopyridin (3-Aza-4-nitro-/4-aminobiphenyl)ⁱ und von 4-Nitrostilben benötigt. Während die carbocyclischen unsubstituierten Grundkörper lange literaturbekannt und z.T. kommerziell erhältlich sind, wurden viele ihrer Derivate (mit heteroaromatischem Gerüst oder zusätzlichen Substituenten) hier zum ersten Mal rein hergestellt und charakterisiert.

Der Ames-Test erfordert extrem reine Substanzen, da Verunreinigungen durch Nebenprodukte Ergebnisse völlig verfälschen und unbrauchbar machen können – insbesondere solche, die stärker mutagen sind als das Hauptprodukt. Gerade polynitrierte Verunreinigungen, die als Nebenprodukte bei Nitrierungen gebildet werden, haben häufig ein höheres mutagenes Potential als ihre mononitrierten Analoga. Auch Stellungsisomere wie 1-Nitro-2-methylnaphthalin (schwach mutagen) und 2-Nitro-1-methylnaphthalin (stark mutagen) unterscheiden sich in ihren mutagenen Eigenschaften meist sehr stark.¹¹⁸ Ein klassisches Beispiel, das die Bedeutung der Reinheit unterstreicht, stammt von Greibrokk, der bei zwei unterschiedlichen kommerziellen Proben von 1-Nitropyren in TA98 Mutationsraten von 11000 bzw. 5000 Revertanten/ μg fand, während eine hochgereinigte Probe nur 1900 Revertanten/ μg ergab.¹¹⁹ So erwies sich gerade die Reinigung des zu testenden Endprodukts als der zeitaufwendigste Schritt bei der Herstellung. Aromaten mit ähnlichen Substituenten waren z.T. nur durch HPLC oder mehrfache Flashchromatographie voneinander zu trennen. Effiziente Synthesen im Hinblick auf Mutagenitätsuntersuchungen sind daher solche, bei denen möglichst keine stark mutagenen Ausgangsstoffe, Katalysatoren oder Lösungsmittel verwendet werden, bei denen keine mutagenen Nebenprodukte entstehen können, bzw. solche, die eine gute Abtrennung des Produkts von eventuellen Kontaminationen erlauben. Zusätzlich ergibt sich die Forderung nach regioselektiven Reaktionen, so daß keine Stellungsisomere voneinander getrennt werden müssen.

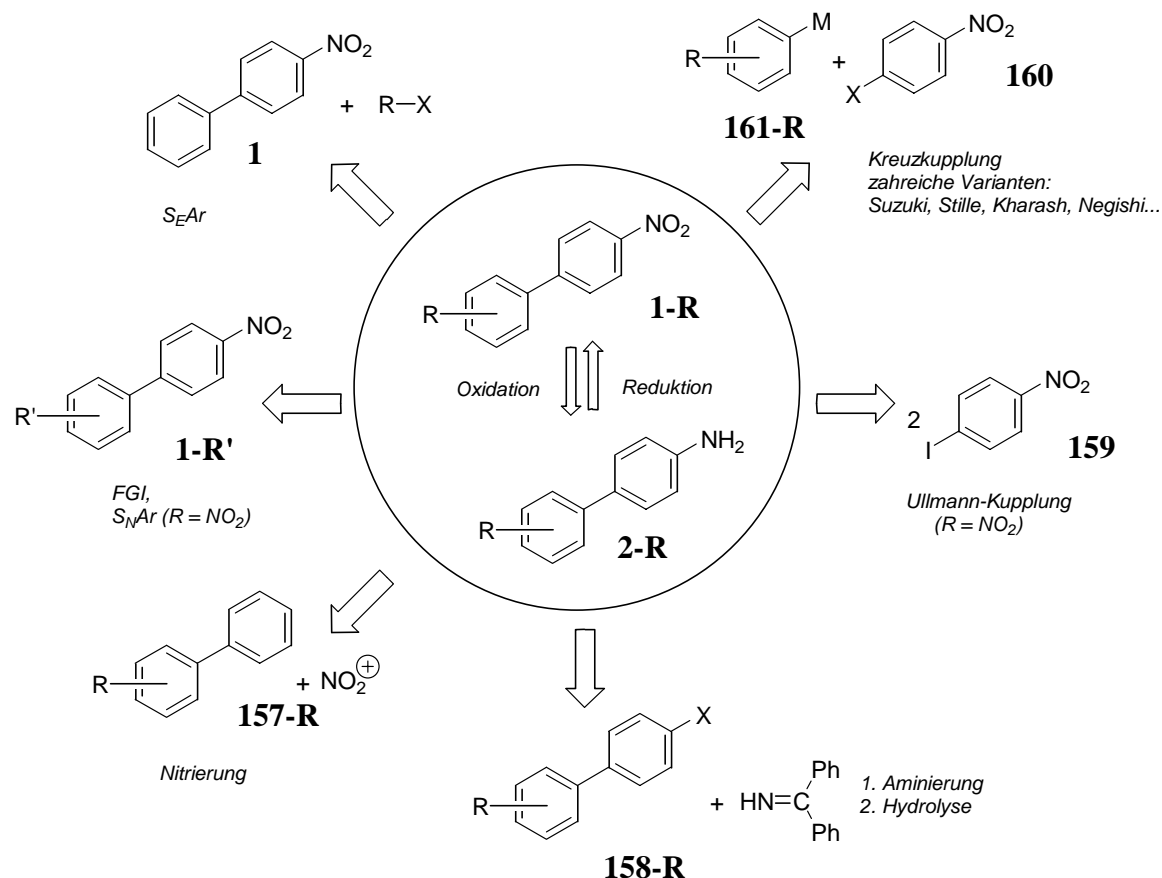
ⁱ 2-Phenyl-5-nitropyridin und 5-Phenyl-2-nitro-/2-aminopyridin leiten sich von den 4-Nitro-/4-Aminobiphenylen dadurch ab, daß im Kohlenstoffskelett ein CH-Fragment durch Stickstoff ersetzt worden ist.



E.2 4-Nitro-/4-Aminobiphenyle

Substituierte 4-Nitrobiphenyle **1-R** und 4-Aminobiphenyle **2-R** haben eine einfache chemische Struktur und sind über zahlreiche Routen darstellbar. Einen Überblick über gängige Synthesestrategien gibt Abb. 25 (R bezeichnet hier einen allgemeinen Substituenten).

Abb. 25 Retrosynthese von Nitro/Aminobiphenylen

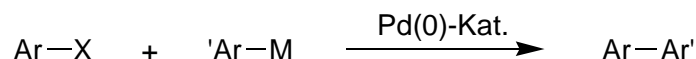


Ein möglicher Ansatz zur Darstellung der Zielmoleküle **1-R** oder **2-R** besteht in der Modifikation des 4-Nitro-/4-Aminobiphenylsystems durch Einführung und/oder Umwandlung des Substituenten R. Zur Darstellung eines Alkyl-substituierten Nitrobiphenyls wäre beispielsweise eine Sequenz aus Acylierung von **1** und chemoselektiver Carbonyl-Reduktion denkbar. Umgekehrt können die Nitro- oder die Aminogruppe durch Nitrierung von **157-R** oder durch Aminierung von **158-R** eingeführt werden. Wesentlich variabler sind Methoden, bei den die Phenylringe verknüpft werden. Ältere Methoden wie die klassische Ullmann-Kupplung¹²⁰ mit 4-Iodnitrobenzol **159** oder die Pschorr-Reaktion geben allerdings meist schlechte Ausbeuten, tolerieren nur wenige funktionelle Gruppen und liefern schwer zu trennende Stoffgemische. Reaktionen wie die Benzidin-Umlagerung (nur für Benzidine) und die oxidative Kupplung (nur für elektronenreiche Aromaten wie Phenole anwendbar) sind zur Darstellung der Zielmoleküle ungeeignet.¹²¹ Auch die Oxidation gemischter Diarylcuprate des Typs

$\text{ArAr}'\text{Cu}(\text{CN})\text{Li}_2$ nach Lipshutz lässt sich zur Darstellung unsymmetrisch substituierter Amino- oder Nitrobiphenyle nicht nutzen, da hierbei Lithiumorganyle¹²² eingesetzt werden.ⁱ Die Klasse der Übergangsmetall-katalysierten Kreuzkupplungen und ihre zahlreiche Varianten erlauben heute aber einen bequemen und regioselektiven Aufbau des Biphenylgerüsts.

E.2.1 Kreuzkupplungen – Übersicht

Als wichtigstes Verfahren zum Aufbau des Biarylgerüsts wurden in dieser Arbeit Palladium-katalysierteⁱⁱ Kreuzkupplungen durchgeführt, die im folgenden kurz diskutiert werden sollen. Einen aktuellen Überblick zu diesem Thema gibt Stanforth.¹²³ Das Grundprinzip besteht darin, in Gegenwart eines Palladium(0)-Katalysators eine metallorganischen Verbindung ($\text{Ar}'\text{-M}$) mit einem Arylhalogenid oder Aryltriflat (Ar-X) zum entsprechenden Kupplungsprodukt ($\text{Ar-Ar}'$) umzusetzen.



Obwohl in der Literatur der erfolgreiche Einsatz einer ganzen Reihe von metallorganischen Komponenten beschrieben ist (z.B. $\text{M} = \text{Li, Mg, Zn, B, Al, Sn, Si, Hg, Tl, Cu, Ni}$)¹²⁴ haben sich in der Praxis nur wenige Reagenzien wie Zink- (**Negishi-Reaktion**), Bor- (**Suzuki-Reaktion**) und Zinnverbindungen (**Stille-Reaktion**) wirklich etabliert.

E.2.1.1 Suzuki-Kupplungen

In den frühen achtziger Jahren entdeckte Suzuki ein Verfahren zur Palladium-katalysierten Kupplung von Phenylboronsäuren (1.1 Äquiv.) mit Halogenaromaten (1.0 Äquiv.) in einem Zweiphasensystem (Toluol/Wasser bzw. Benzol/Wasser) in Gegenwart von Base (2.0 Äquiv.).¹²⁵ Die Standard-Suzuki-Reaktion toleriert viele funktionelle Gruppen, die unter basischen Bedingungen stabil sind oder nur langsam hydrolysieren. Nitro-, Alkoxy-, Hydroxy-, Dialkylamino-, Cyano-, Keto- und z.T. auch aromatische Estersubstituenten am Halogenaromaten stören die Reaktion nicht, dafür aber elektronenziehende Gruppen an der Boronsäure, da sie die Geschwindigkeit der hydrolytischen Deboronierung stark erhöhen.¹⁴⁵ Mittlerweile wurden allerdings eine große Anzahl neuerer Protokolle entwickelt, die die ursprüngli-

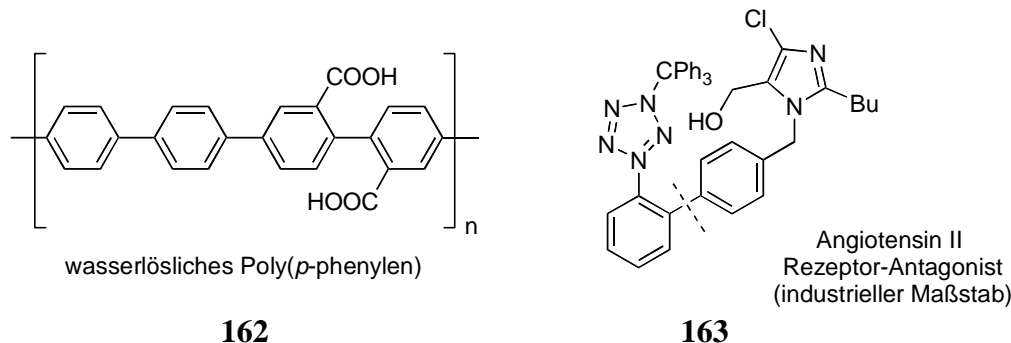
ⁱ Die Cuprate werden aus Lithiumorganylen synthetisiert. Es werden daher nur funktionelle Gruppen toleriert, die kompatibel zu Lithiumorganylen sind. Nitrogruppen, die bereits bei $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ Redoxreaktionen mit Lithiumorganylen eingehen, oder Aminogruppen mit ihren aziden Protonen gehören nicht dazu.

ⁱⁱ Statt Palladium können auch die billigeren Nickel-Katalysatoren verwendet werden. Nickel(0) ist allerdings wesentlich oxidationsempfindlicher und die Ausbeuten schwanken stärker. Aus toxikologischer Sicht ist die Verwendung von Nickel nicht zu empfehlen, da Nickel-Verbindungen nachweislich kanzerogen sind und DNA-Replikation und DNA-Reparatur hemmen.

che Methode enorm erweitert haben (Variation von Lösungsmitteln, Katalysatoren, Basen, Kupplungskomponenten). So lassen sich außer Aryliodiden, -bromiden, -triflaten¹²⁶ oder hypervalenten Iodreagenzien¹²⁷ heute auch Arylchloride effizient kuppeln¹²⁸. Entscheidend für die Kupplung von Arylchloriden sind hocheffiziente Pd-Katalysatoren, die nur einen großen Trialkylphosphanliganden (PCy_3 , PtBu_3) tragen. Im Gegensatz zur Stille-Reaktion finden sich in der Literatur außerdem ausgearbeitete, allgemein anwendbare Varianten zur Kupplung sterisch anspruchsvoller Komponenten (sowohl für Boronsäuren als auch für ihre Kupplungspartner).¹²⁹ Auch wasserfreie Varianten, bei denen keine Hydrolysen Nebenreaktionen auftreten können, sind bekannt.

Aus toxikologischer Sicht ist die Suzuki-Reaktion unproblematisch, da weder Boronsäuren noch Palladium und seine Komplexe genotoxische Wirkungen zeigen. Boronsäuren sind zudem synthetisch einfach zugänglich und problemlos zu handhaben. Suzuki-Reaktionen wurden bereits für die Synthese von Polymeren wie dem wasserlöslichen **162**, Naturstoffen oder Pharmaka wie Angiotensin II **163** eingesetzt und sind auch im industriellen Maßstab durchführbar (Abb. 26).

Abb. 26: Einsatzmöglichkeiten der Suzuki-Reaktion



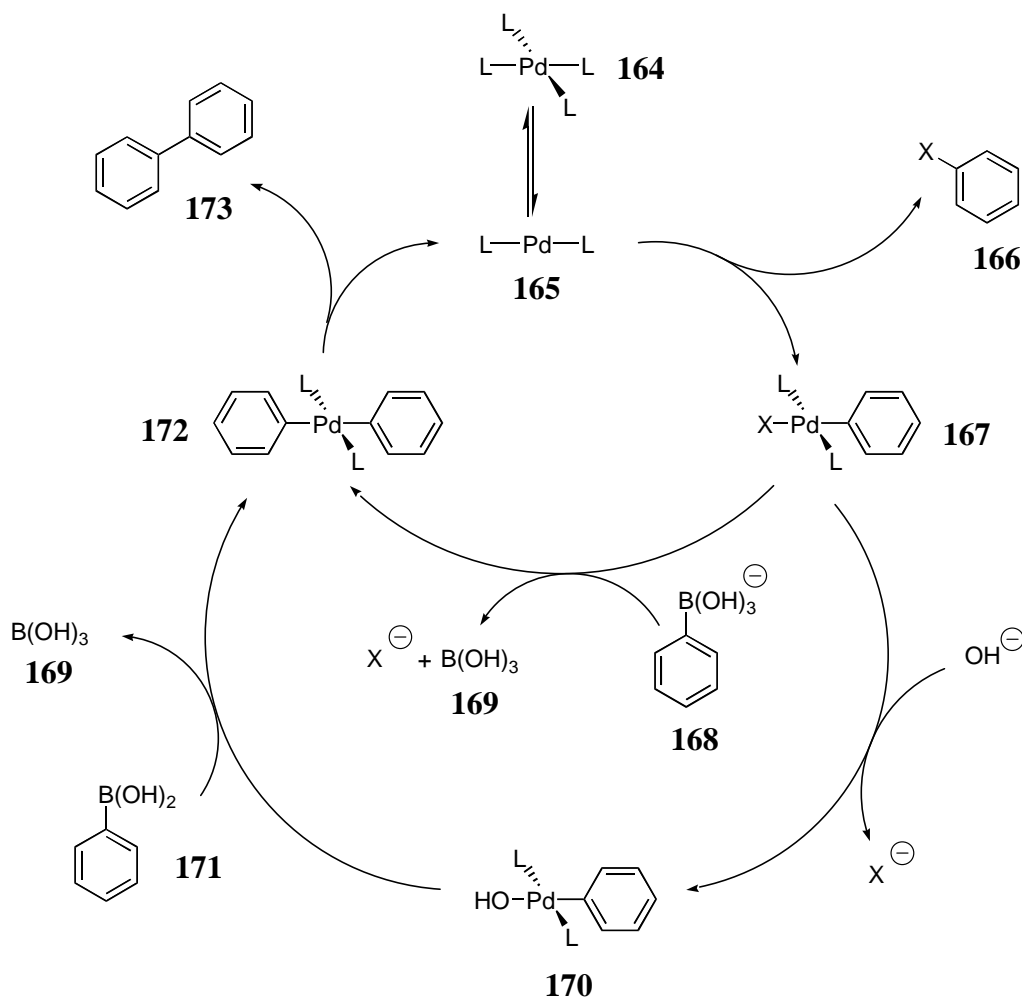
Der Mechanismus der Kupplung von Arylboronsäure und Arylhalogenid (Ar-X) in Gegenwart von Base läßt sich am besten anhand eines typischen Katalysezyklus (Abb. 27) diskutieren.¹³⁰ Die Mechanismen der Stille- und der Negishi-Reaktion sind prinzipiell sehr ähnlich.

Die eigentlich aktive Spezies und damit der Ausgangspunkt des Zyklus ist ein koordinativ ungesättigter Palladium(0)-Komplex **165**, der durch Dissoziation zweier Liganden aus Verbindungen wie $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ **164** ($\text{L} = \text{PPh}_3$) entsteht.ⁱ Durch oxidative Addition des Halogenaromaten **166** (Ar-X) entsteht ein stabiler *trans*- σ -Palladium(II)-Komplex **167**.¹²⁴ Dieser Ad-

ⁱ Neben $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (als fertiger Komplex oder *in situ* generiert aus $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ und Triphenylphosphin) werden zahlreiche andere Palladiumkomplexe mit Liganden wie Trifurylphosphin (4 Äquiv.), dppf (1.1 Äquiv.), Tri(*o*-toluyl)phosphin (4 Äquiv.), Tri-*tert*-butylphosphin (1 - 1.5 Äquiv.) etc. eingesetzt.

ditionsschritt ist in vielen Fällen geschwindigkeitsbestimmend und die Reaktivität sinkt mit der Art des Substituenten X in der Reihenfolge $I > OTf > Br \gg Cl$, so daß Chloride nur mit besonders aktiven Katalysatoren gekuppelt werden können.

Abb. 27: Katalysezyklus der Suzuki-Reaktion



Die eigentliche Transmetallierung – also die Übertragung des aromatischen Restes der Boronsäure **171** auf das Palladium – ist bisher am wenigsten verstanden. Sicher ist, daß dieser Schritt nur in Gegenwart der Base stattfindet. In diesem Zusammenhang werden zwei Mechanismen diskutiert.¹³¹ Entweder (Abb. 27, unterer Weg) findet zuerst eine nukleophile Substitution am Palladium statt, bei der das Halogen durch die Hydroxygruppe unter Bildung von **170** ersetzt wird. Anschließend erfolgt der Austausch des Arylrestes gegen die Hydroxygruppe zum *trans*-Diaryl-Palladium-Komplex **172**. Alternativ wird diskutiert, daß nicht die Boronsäure **171** selbst, sondern ihr Boronat-Anion **168**, das sich bei höheren pH-Werten bildet,¹³² an der Transmetallierung beteiligt ist.¹⁴⁰ Die reduktive Eliminierung des Biphenyls **173** erfolgt erst nach Isomerisierung des *trans*-Diaryl-Palladium-Komplexes **172** zum entsprechenden *cis*-Komplex. Auf diese Weise wird die koordinativ ungesättigte Palladium(0)-Spezies **165** zurückgebildet und der Zyklus kann erneut durchlaufen werden.

rückgebildet und der Zyklus kann erneut durchlaufen werden. Eine genauere Diskussion des Mechanismus gibt Suzuki.¹³³

E.2.1.2 Negishi-Kupplungen

Eine Alternative zur Suzuki-Reaktion ist die Negishi-Kupplung, die bereits Mitte der siebziger Jahre entwickelt wurde. Hier werden Zinkaryle unter Palladium-Katalyse mit Halogenaromaten in wasserfreien Lösungsmitteln (meist THF) gekuppelt. Als Katalysatoren können dieselben Palladium-Verbindungen wie bei der Suzuki-Reaktion benutzt werden. Im Vergleich zu den Boronsäuren sind die Zinkaryle im allgemeinen reaktiver und Kupplungen mit Aryliodiden oder elektronenarmen Arylbromiden verlaufen schon bei Raumtemperatur. Allerdings finden auch mehr Nebenreaktionen statt, da Zinkaryle einige funktionelle Gruppen, wie z.B. Nitroverbindungen, bei höherer Temperatur reduzieren können. Die Reaktionsbedingungen und vor allem die Aktivität des verwendeten Katalysators müssen daher an das jeweilige Syntheseproblem angepaßt werden. Als Kupplungspartner scheiden zudem alle Verbindungen aus, die azide Protonen tragen. Hierzu gehören auch die für diese Arbeit wichtigen Aminogruppen oder geschützte (Acetyl, BOC) Amine. Andere funktionelle Gruppen, vor allem basenlabile (z.B. Ester), die bei der Suzuki-Reaktion Probleme bereiten können, werden dagegen toleriert. Negishi-Kupplungen sind daher eine wichtige Ergänzung zur Suzuki-Reaktion. Mechanistisch wird ein ähnlicher Katalyse-Zyklus durchlaufen wie bei der Suzuki-Reaktion (Abb. 27). Anders verläuft nur der Transmetallierungsschritt: Der Arylrest der Zinkspezies kann nämlich direkt auf das Produkt der oxidativen Addition übertragen werden, ohne daß hierzu Base notwendig wäre.

E.2.1.3 Stille-Kupplungen

Die Stille-Reaktion, bei der man Arylstannane (Ar-SnR_3 , $\text{R} = \text{Me, Bu}$)ⁱ einsetzt, verläuft unter milden, neutralen Bedingungen und toleriert eine breite Palette funktioneller Gruppen (Nitro, Aldehyd, Keton, Ester, etc.) an beiden Kupplungs-Partnern.¹³⁴ Außer Arylhalogeniden und Aryltriflaten wurden auch Diazoniumsalze¹³⁵ oder hypervalente Iodreagenzien¹³⁶ eingesetzt. Ein ausgesprochener Nachteil dieser Reaktion ist die hohe Toxizität der organischen Zinnverbindungen.¹³⁷ Neuere Untersuchungen belegen zudem, daß zinnorganische Verbindungen mutagen sind.¹³⁸ Im Hinblick auf die Reinheitsanforderungen für den Ames-Tests wurde auf

ⁱ Arylgruppen werden viel schneller als Alkylgruppen übertragen, so daß keine alkylierten Nebenprodukte entstehen.

Stille-Kupplungen daher weitgehend verzichtet. Im folgenden sollen nun die Synthesen der von 4-Nitro-/4-Aminobiphenyl abgeleiteten Modellverbindungen vorgestellt werden.

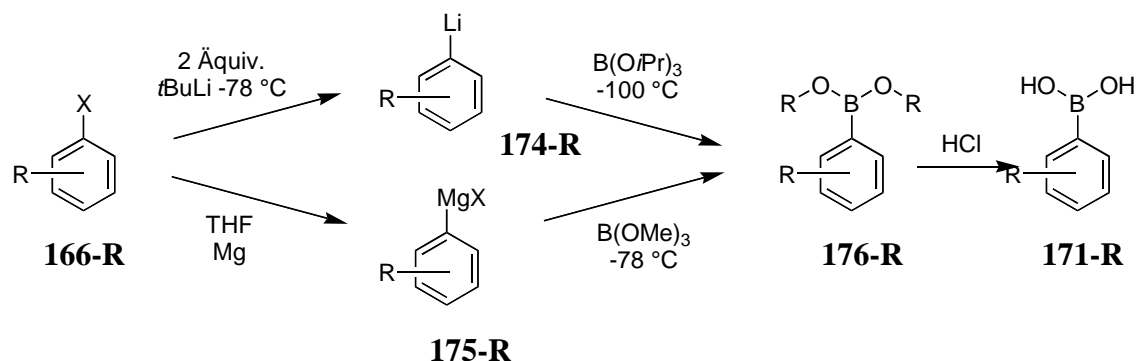
E.2.2 Alkyl/CF₃-substituierte Verbindungen und Derivate

Aus der Literatur und durch Untersuchungen im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit war bekannt, daß Alkyl-substituierte 4-Nitrobiphenyle in hohen Ausbeuten durch Suzuki-Kreuzkupplung von substituierten Boronsäuren und 4-Bromnitrobenzol darstellbar sind.²⁴⁸

E.2.2.1 Darstellung Alky-substituierter 4-Nitrobiphenyle durch Suzuki-Reaktion

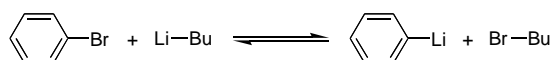
Phenylboronsäuren **171-R** lassen sich durch Arylierung von Trialkylboraten (Trimethylborat, Tri-*iso*-propylborat, etc.) mit metallorganischen Reagenzien (Ar-Li, Ar-MgX) und anschließender saurer Hydrolyse von **176-R** gewinnen.

Abb. 28: Synthese von Boronsäuren



Die dafür benötigten Aryl-Magnesium- bzw. Aryl-Lithium-Verbindungen **174-R** und **175-R** sind im allgemeinen durch Standard-Reaktionen (Grignard-Reaktion für Ar-MgX; Halogen-Metall-Austausch¹³⁹ für Ar-Li)ⁱ aus den entsprechend substituierten Arylbromiden/-iodiden **166-R** leicht zugänglich. Gute Ausbeuten (70 - 85 %) bei der Umsetzung mit den Boraten ergeben sich allerdings nur, wenn man die Reaktionspartner und die Reaktionsbedingungen aufeinander abstimmt. Zur Verhinderung von Mehrfacharylierungen wurden die sehr reakti-

ⁱ Zum Halogen-Metall-Austausch wird ein Arylhalogenid in Ether oder THF (Iodide oder Bromide, Chloride reagieren schlecht) mit 1.1 Äquiv. *n*BuLi bei -78 °C versetzt. Nach einem bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus werden Lithium und Halogenid so ausgetauscht, daß die weniger basische Lithiumverbindung entsteht.



Um die Bildung des *n*-Butylhalogenids, das durch Nebenreaktionen stören kann, zu verhindern, kann diese Reaktion auch mit 2 Äquiv. *t*BuLi durchgeführt werden. Das zweite Äquivalent *t*BuLi reagiert mit *tert*-Butylhalogenid in einer E1-Eliminierung zu Buten und Butan, die beim Erwärmen gasförmig entweichen. Die analoge Eliminierungsreaktion mit Ar-Li tritt dagegen kaum ein.¹³⁹

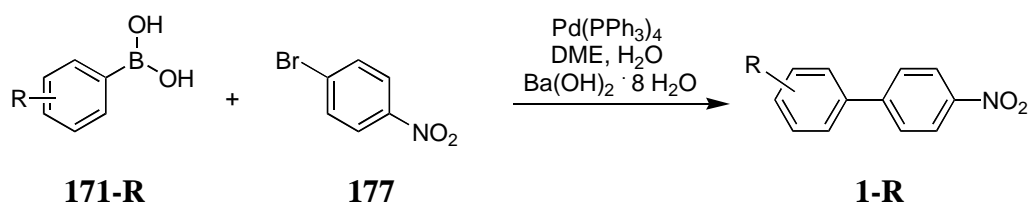
ven Lithiumarylverbindungen bei $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ einer Lösung des sterisch gehinderten Tri-*iso*-propylborats $\text{B}(\text{OiPr})_3$ zugetropft werden, während die Grignard-Reagenzien auch bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit dem billigeren Trimethylborat $\text{B}(\text{OMe})_3$ umgesetzt werden konnten.²⁴⁸

Ein Vorteil der Grignard-Variante liegt darin, daß man sie leicht auch in größerem Maßstab durchführen kann. Die teurere Lithium-Variante ist für kleinere Ansätze jedoch besser geeignet, da hier im Gegensatz zur Darstellung des Grignards keine Nebenprodukte durch radikalische Kupplungsreaktionen entstehen. Die Reaktion mit dem Trialkylborat folgt einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus.²⁴⁸

Außer den Alkylderivaten können nach dieser Methode auch Boronsäuren mit anderen Substituenten (z.B. Alkoxy-, Chlor-, Fluor-) hergestellt werden. Voraussetzung ist dabei, daß die jeweiligen Substituenten kompatibel zu lithium- oder magnesiumorganischen Verbindungen sind. 4-Nitro- oder 4-Aminophenylboronsäure, die ebenfalls zur Darstellung der entsprechenden Biphenyle geeignet wären, sind auf diese Weise nicht zugänglich.ⁱ

Bei der anschließenden Suzuki-Reaktion erwies es sich als wichtig, einen möglichst vollständigen Umsatz zu erzielen, da das als Kupplungspartner verwendete 4-Bromnitrobenzol **177** nur schwierig vom Reaktionsprodukt abzutrennen war. An Stelle der Standard-Methode¹²⁵ wurde deshalb eine leicht abgewandelte Variante benutzt, bei der statt Toluol/Wasser eine 10:1-Mischung aus DME und Wasser als Lösungsmittel diente und das Natriumcarbonat durch einen dreifachen Überschuß von Bariumhydroxid ersetzt wurde. Als Katalysator wurden 2-3 mol% $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ zugegeben.

Abb. 29: Alkylierte 4-Nitrobiphenyle durch Suzuki-Kupplung

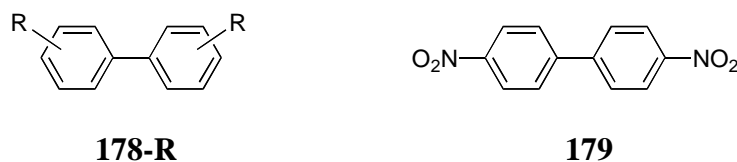


Unter diesen Bedingungen (Reflux, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$) nahm die Kupplungsgeschwindigkeit stark zu.¹²⁹ Die stärkere Base Bariumhydroxid erhöht wahrscheinlich die Konzentration des Arylborat-anions **168** (vgl. Abb. 27), das reaktiver als die neutrale Boronsäure ist, so daß der aromatische Rest schneller auf das Palladium übertragen wird.¹⁴⁰ Da die Kupplungen in der Regel über Nacht durchgeführt wurden, garantierten die vergleichsweise langen Reaktionszeiten

ⁱ Nach einem ganz neuen Verfahren können Arylboronsäureester direkt aus Arylhalogeniden durch Kreuzkupplung mit Alkoxydiboron gewonnen werden. Diese Reaktion toleriert auch Nitrogruppen.¹³¹

(10 - 20 Stunden) vollständigen Umsatz. Als Nebenprodukt wurde jeweils das Homokuppelungsprodukt **178-R** der im Überschuß eingesetzten Boronsäure gebildet, nicht jedoch das stark mutagene 4,4'-Dinitrobiphenyl **179**.

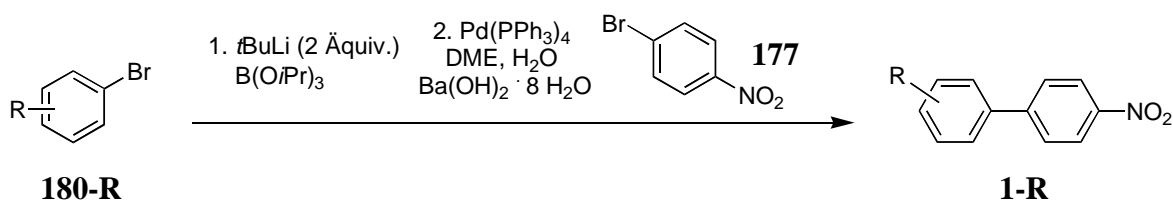
Abb. 30: Mögliche Nebenprodukte des Suzuki-Kupplung



E.2.2.2 Darstellung Alky-substituierter 4-Nitrobiphenyle durch das Eintopf-Verfahren

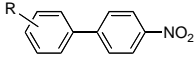
Die reproduzierbar hohen Ausbeuten bei der Boronsäuredarstellung über die Aryl-Lithium-Verbindungen boten eine gute Grundlage zur Vereinfachung dieser Nitrobiphenylsynthese. Statt die Boronsäuren **171-R** nach der Hydrolyse zu isolieren, kann man auch direkt in einem Eintopf-Verfahren mit der Lösung der Boronsäuretri-*iso*-propylesters weiterarbeiten. 4-Bromnitrobenzol **177**, der Katalysator $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Bariumhydroxid und DME wurden der Lösung zugesetzt und die Mischung erhitzt. Erste erfolgreiche Kupplungen nach dieser Methode wurden bereits im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit durchgeführt.²⁴⁸

Abb. 31: Alkylierte 4-Nitrobiphenyle durch das Eintopf-Verfahren



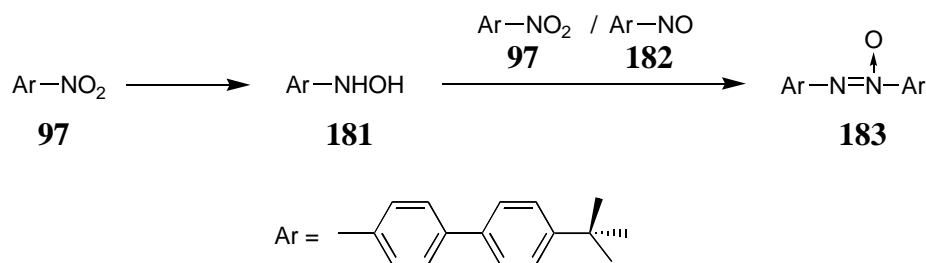
Wichtig ist, daß überschüssiges Lithiumorganyl vorher durch Zugabe von Wasser zerstört wurde, da es sonst zu Redoxreaktionen mit dem Nitroaromaten kam, die die Reaktion störten. Auch die Menge des Katalysators konnte auf die Hälfte oder ein Drittel der üblichen 3 mol% verringert werden, ohne daß die Ausbeuten zurückgingen. In Tabelle 8 sind die einzelnen Kupplungsreaktionen zusammengefaßt. Die Ergebnisse belegen, daß das Eintopf-Verfahren einen effizienten und einfachen Zugang zu alkylierten 4-Nitrobiphenylen bietet.

Tabelle 8: Ergebnisse der Suzuki-Kupplungen

Eintrag	Methode ^a	Produkt		Ausbeute ^b
1	A	4NBp	1	92 %
2	A/B	4'Me-4NBp	94	81/71 %
3	A/B	4'Et-4NBp	95	92/91 %
4	A/B	4'iPr-4NBp	96	91/91 %
5	A/B	4'tBu-4NBp	97	81/85 ^c , 45 % ^d
6	A	4'nBu-4NBp	98	80 %
7	B	3'Me-4NBp	99	87 %
8	B	3',5'DiMe-4NBp	100	95 %
9	B	3',5'Di <i>t</i> Bu-4NBp	101	73 %
10	B	4'Ad-4NBp	102	65 %
11	B	4NTp	103	79 %

^a Methode A: Pd(PPh₃)₄ (3 mol%), Boronsäure (1.1 Äquiv.), 4-Bromnitrobenzol (1.0 Äquiv.), Ba(OH)₂ (1.5 Äquiv.) in DME/Wasser bei 80 °C für 10 - 20 Stunden. Methode B: Eintopf-Verfahren, Boronester (1.2 Äquiv.), Pd(PPh₃)₄ (0.8 - 2.5 mol%), sonst wie Methode A. ^b Isolierte Ausbeute, bezogen auf 4-Bromnitrobenzol. ^c Ansatz 10 mmol. ^d Ansatz 100 mmol (siehe Text).

In einem Fall wurde allerdings die Bildung eines Nebenprodukts beobachtet, das bei der Standard-Suzuki-Reaktion nicht auftritt. So wurden bei der Herstellung von 4'-*tert*-Butyl-4-nitrobiphenyl **97** bei einer Ansatzgröße von 100 mmol neben dem Kreuzkupplungsprodukt (45 %) größere Mengen 4,4'-Di-*tert*-butylazoxybiphenyl **183** isoliert. Ein analoger Versuch mit einer Ansatzgröße von 10 mmol hatte dagegen das Produkt **97** in sehr guter Ausbeute geliefert (85 %).

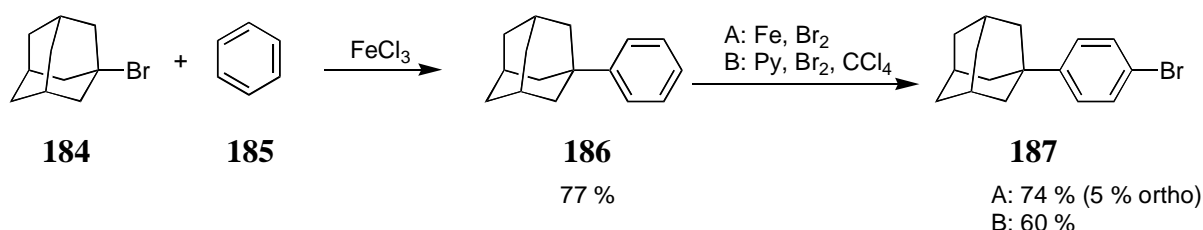
Abb. 32: Bildung von 4,4'-Di-*tert*-butylazoxybiphenyl **183**

Azoxy-Verbindungen wie **183** bilden sich durch Reaktion von Hydroxylaminen **181** mit entsprechenden Nitroso- oder Nitroaromaten (**182** oder **97**). Offensichtlich wurde bei dem größeren Ansatz ein Teil des entstandenen Kupplungsproduktes zum Hydroxylamin reduziert (z.B. durch nicht umgesetztes Aryllithium oder den Boronester selbst).

E.2.2.3 Darstellung der Edukte

Bis auf 4-Brom(1-adamantyl)benzol **187** und 1-Brom-3,5-di-*tert*-butylbenzol **189** waren die als Edukte verwendeten Bromalkylbenzole (und 4-Brombiphenyl) alle kommerziell erhältlich. Die Synthese von 4-Brom(1-adamantyl)benzolⁱ **187** erfolgte durch Bromierung von (1-Adamantyl)benzol **186**, das selbst nach einer Methode von Stetter¹⁴¹ durch Alkylierung von Benzol **185** mit 1-Adamantylbromid **184** zugänglich war.

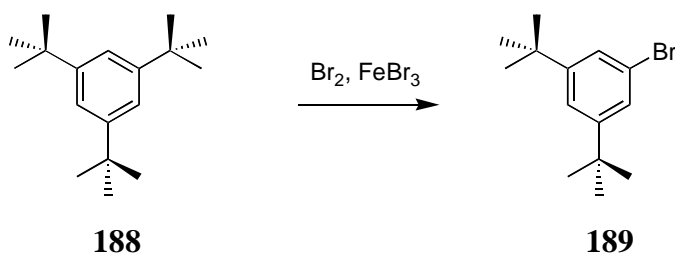
Abb. 33: Synthese von 4-Brom(1-adamantyl)benzol **193**



Erstaunlicherweise entstanden trotz des großen sterischen Anspruchs der Adamantylgruppe bei der Bromierung unter FeBr₃-Katalyse (Methode A) einige Prozent der *ortho*-bromierten Verbindung als Nebenprodukt. Mildere Bedingungen (Methode B, Pyridin als Katalysator¹⁴²) ergaben regioselektiv das gewünschte Produkt, allerdings erfolgte die Reaktion nur langsam (2 Tage) und der Umsatz war niedriger.

1-Brom-3,5-di-*tert*-butylbenzol **189** wurde nach Murphy¹⁴³ durch *ipso*-Substitution aus 1,3,5-Tri-*tert*-butylbenzol **188** gewonnen.

Abb. 34: Synthese von 1-Brom-3,5-di-*tert*-butylbenzol **189**



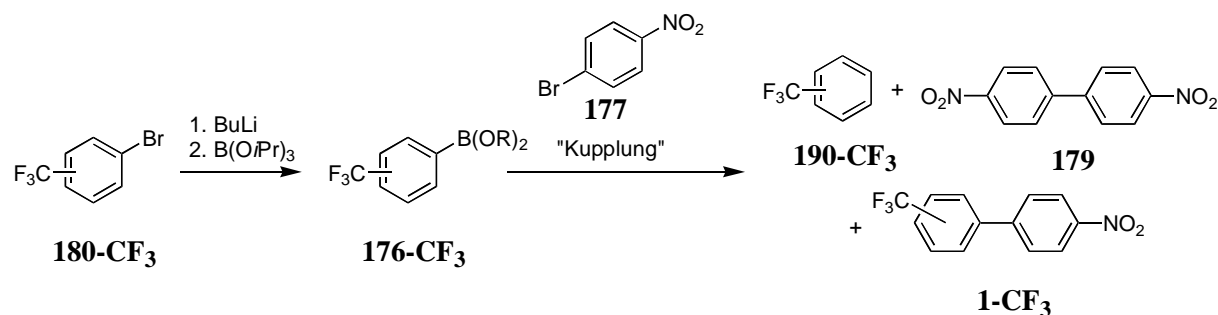
Die De-*tert*-butylierung erfolgt hier in Gegenwart des lewissauren FeBr₃ viel schneller als die sterisch stark gehinderte Substitution der Wasserstoffatome.¹⁴⁴

ⁱ Es wurden einige Versuche unternommen, in Anlehnung an Suzuki-Reaktionen 4-Bromphenylboronsäure in Gegenwart von Ti₂CO₃ mit 1-Adamantyljodid/bromid unter Palladiumkatalyse zu kuppeln.¹⁷⁵ Bei Adamantyl-Kupplungen sollten nach der Bredtschen Regel keine β-Hydrideliminierungen auftreten. Das gewünschte Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden: Entweder fand überhaupt keine Reaktion statt oder es bildete sich das Homokupplungsprodukt. Kupplungen von 4-Bromphenylmagnesiumchlorid mit 1-Adamantylchlorid in Dichlormethan ohne Übergangsmetallkatalyse ergaben 4-(1-Adamantyl)brombenzol in einer Ausbeute von 24 %.¹⁷⁶

E.2.2.4 Darstellung der CF₃-substituierter 4-Nitrobiphenyle durch Negishi-Reaktion

Die guten Ergebnisse der Eintopf-Suzuki-Kupplung bei den alkylierten Nitroaromaten ließen sich nicht auf die CF₃-substituierten Derivate übertragen. In mehreren Versuchen erhielt man das gewünschte Kreuzkupplungsprodukt **1-CF₃** jeweils nur in Ausbeuten unter 20 %. Statt dessen wurden das debromierte Edukt **190-CF₃**, unverändertes 4-Bromnitrobenzol **177** und 4',4-Dinitrobiphenyl **179** gewonnen. Das Problem ist dabei nicht etwa die Bildung des Boronsäureesters, sondern dessen hydrolytische Deboronierung, die als Konkurrenzreaktion neben der Kupplung abläuft.¹⁴⁵

Abb. 35: Deboronierung bei CF₃-substituierten Boronsäuren



So haben kinetische Studien von Abraham über die Reaktion substituierter Boronsäuren ergeben, daß sowohl elektronenziehende als auch elektronenschiebende Substituenten die Geschwindigkeit der Deboronierung erhöhen.¹⁴⁵ Auch die hohe Basenkonzentration der gewählten Bedingungen (DME, Wasser, Bariumhydroxid) fördert wahrscheinlich die Hydrolyse.

Eine Alternative bot die Negishi-Reaktion, bei der unter wasserfreien Bedingungen ohne weiteren Zusatz von Base gearbeitet wird. Hydrolysereaktionen sollten somit keine Rolle spielen. Tatsächlich ergab die Kupplung der CF₃-substituierten Zinkaryle **191-CF₃** in THF bei Raumtemperatur mit Pd(PPh₃)₄ gute Ausbeuten der Kreuzkupplungsprodukte. Die Zinkaryle wurden aus den käuflichen Edukten über die Lithiumverbindungen durch Transmetallierung mit wasserfreiem Zinkchlorid hergestellt.

Abb. 36: Reaktionsfolge der Negishi-Kupplung (CF₃-substituierte 4-Nitrobiphenyle)

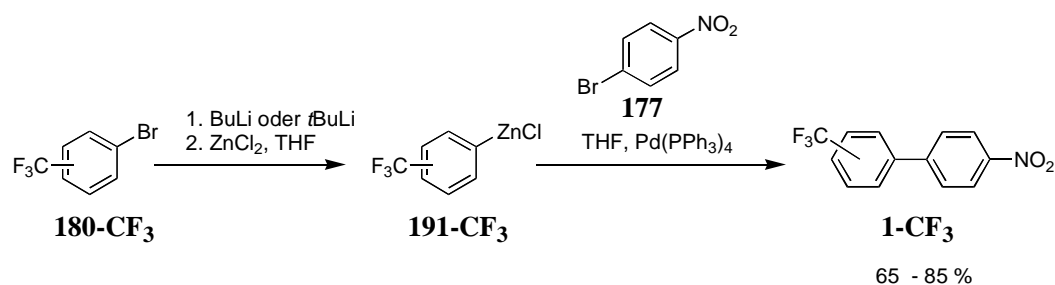
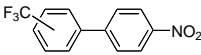


Tabelle 9: Ergebnisse der Kreuz-Kupplungen bei CF₃-substituierten 4-Nitrobiphenylen

Eintrag	Methode	Produkt		Ausbeute ^b
1	Suzuki ^a	4'CF ₃ -4NBp	126	~10 %
2	Suzuki	3'CF ₃ -4NBp	127	~15 %
3	Negishi ^b	4'CF ₃ -4NBp	126	85 %
4	Negishi	3'CF ₃ -4NBp	127	65 %
5	Negishi	3',5'DiCF ₃ -4NBp	128	67 %

^a Suzuki: Eintopf-Verfahren (siehe Tabelle 8). ^b Negishi: Pd(PPh₃)₄ (3 mol%), Zinkaryl (1.2 Äquiv.), 4-Bromnitrobenzol (1.0 Äquiv.), THF, RT, 16 Stunden. ^c Isolierte Ausbeute.

Bei der Synthese der CF₃-Aryl-Lithium-Verbindungen ist allerdings Vorsicht geboten. Der Halogen-Metall-Austausch mit *n*BuLi (1.1 Äquiv.) oder *t*BuLi (2.0 Äquiv.) ist exotherm (das gebildete Anion ist durch die CF₃-Gruppen gut stabilisiert und damit energiearm)¹⁴⁶ und sollte zur Vermeidung von Nebenreaktionen bei -100 °C durchgeführt werden. **Zudem wurde in einem Fall (Synthese von 126) eine explosionsartige Zersetzung der Reaktionsmischung nach dem Halogen-Metall-Austausch beobachtet, deren Ursache bisher nicht geklärt ist.ⁱ**

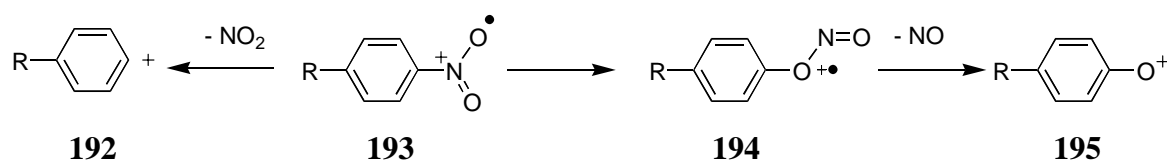
E.2.2.5 Analytik der Nitroverbindungen

Alle Alkyl- und CF₃-substituierten Nitrobiphenyle sind gut kristallisierende, farblose oder schwach gelbe Verbindungen, die sich in Wasser, DMSO oder PE kaum, besser in Dioxan, THF, EE, Chloroform oder siedendem EtOH lösen. Im ¹H-NMR-Spektrum zeigen die 4'-Alkyl-4-nitrobiphenyle aufgrund der unterschiedlichen elektronischen Effekte der Nitro- und Alkylgruppen vier Dupletts, entsprechend der AA'XX'-Systeme in beiden Phenylringen.

In den Massenspektren findet man außer dem Molekülpeak die für Nitroaromaten **193** typischen Fragmentationen: [M - 30]⁺ **195** durch Abspaltung von NO nach Umlagerung zum Nitrit-ester **194** und [M - 46]⁺ **192** durch Abspaltung der Nitrogruppe (NO₂).²⁴⁰

ⁱ Dabei wurde 4-Brom(trifluormethyl)benzol (100 mmol) in Ether bei -100 °C mit einer *t*BuLi-Lösung (220 mmol, Aldrich, 1.6 M in Pentan) umgesetzt. Nach 45 min wurde das Kältebad entfernt und ein Teil des Lösungsmittels im Vakuum abgezogen. Diese Mischung entwickelte plötzlich Gas und explodierte dann, wobei ein brauner Feststoff gebildet wurde (¹H-NMR: keine Aromatensignale, nur Peaks bei 1.5 und 0 ppm, MS (70 eV): kein Signal). In der Literatur gibt es keine Hinweise darauf, daß 4-Trifluormethylphenyllithium nicht instabil ist. 2,4,6-Tris(trifluormethyl)phenyllithium ist thermisch sogar ausgesprochen stabil.¹⁴⁶ Wahrscheinlich zersetzt sich die CF₃-Verbindung unter Bildung von LiF.

Abb. 37: Fragmentierung von Nitroaromaten

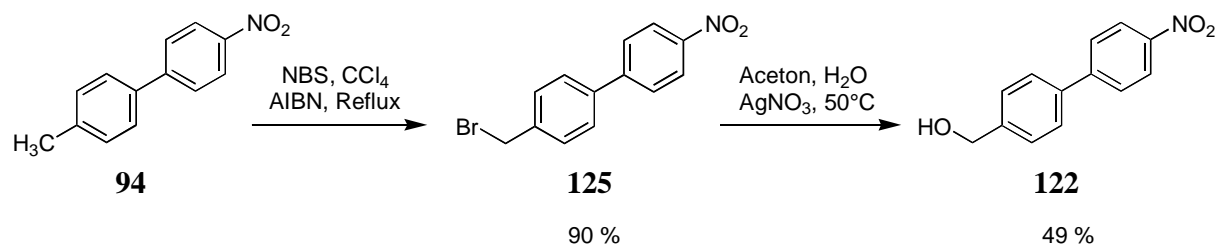


Bei den Alkyl-substituierten Verbindungen beobachtet man zusätzlich Fragmentationen, die durch Methylverlust (bei Me, Et, *i*Pr, *t*Bu, *n*Bu) oder Butylverlust (bei *n*Bu, Ad) aus dem Molekulation oder den obigen Fragmenten gebildet werden. Die 4-Nitrobiphenyle mit den CF₃-Gruppen zeigen neben der NO/NO₂-Fragmentierung als Folgereaktion typischerweise auch die Abspaltung von HF [M - NO₂ - 20]⁺ und/oder der CF₃-Einheiten [M - NO₂ - 69]⁺.

E.2.2.6 Darstellung der 4'-α-Hydroxyalkyl-4-nitrobiphenyle

Eine Möglichkeit zur Darstellung von 4'-α-Hydroxyalkyl-4-nitrobiphenylen ist die Hydroxylierung der Benzylposition der entsprechenden 4'-Alkyl-4-nitrobiphenyle. Solche Oxidationen, die *in vivo* durch Cytochrom P 450 katalysiert werden, sind mutmaßlich für die erhöhte Mutagenität einiger Methyl- oder Ethyl-substituierter Nitro-/Aminoaromaten im Vergleich zum Grundkörper verantwortlich (vgl. Kapitel F). Im Labor sind direkte Hydroxylierungen ohne Weiteroxidation zum Aldehyd oder zur Carbonsäure allerdings nur schwierig zu realisieren. Einfacher ist die selektive Einführung von Brom. Die Synthese von 4'-Hydroxymethyl-4-nitrobiphenyl **122** erfolgte daher ausgehend von 4'-Methyl-4-nitrobiphenyl **94** durch radikalische Benzylbromierung mit NBS (→ **125**) und nukleophile Substitution (→ **122**).

Abb. 38: Darstellung 4'-Hydroxymethyl-4-nitrobiphenyl

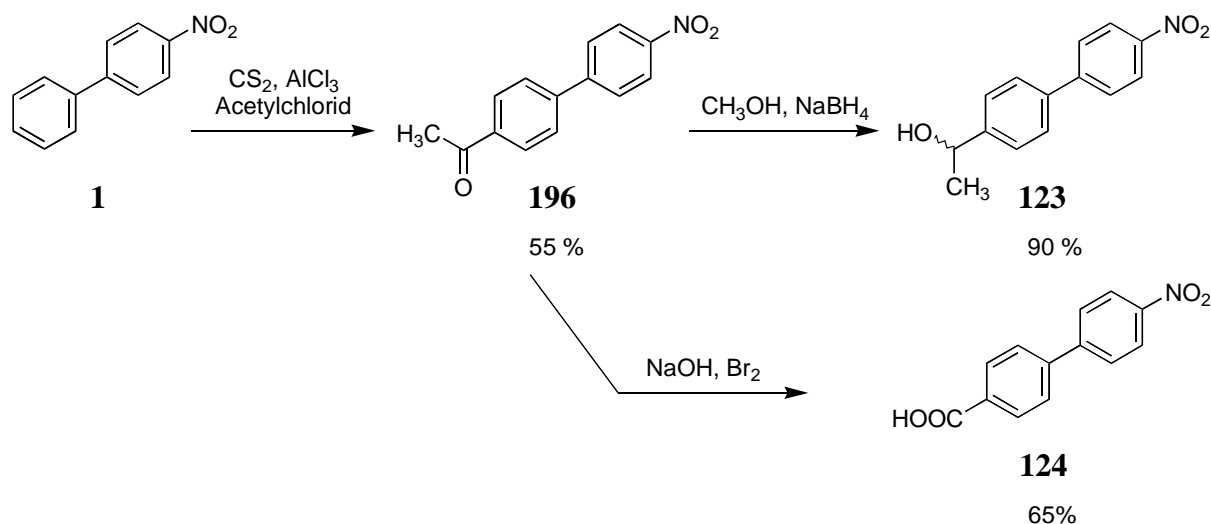


Um die mögliche Bildung von Bisbenzylether zu minimieren, wurde die nukleophile Substitution unter neutralen Bedingungen (Wasser, AgNO₃, Aceton, 50 °C) nach einer Vorschrift von Hayashi¹⁴⁷ durchgeführt und ergab den entsprechenden Alkohol in 49 % Ausbeute.ⁱ

ⁱ Bei der Reaktion wurde als Nebenprodukt das Nitrat gebildet. Unter den Reaktionsbedingungen erfolgte dessen Hydrolyse nur langsam. Durch Umsetzung des Rohproduktes in verdünnter Schwefelsäure ließe sich die Ausbeute wahrscheinlich deutlich erhöhen.

4'-(1-Hydroxyethyl)-4-nitrobiphenyl **123** wurde durch eine zweistufige Synthesesequenz aus Acylierung und Reduktion hergestellt (Abb. 39). Ausgehend von 4-Nitrobiphenyl **1** lieferte die Friedel-Crafts-Alkylierung mit Acetylchlorid in Kohlenstoffdisulfid 4'-Acetyl-4-nitrobiphenyl **196** in einer Ausbeute von 55 %. Die regioselective Einführung der Acetylgruppe in den unsubstituierten Ring erklärt sich aus der Tatsache, daß der andere Phenylring durch die elektronenziehende Nitrogruppe stark deaktiviert ist. Der Phenylring mit der Nitrogruppe fungiert hier als Substituent (-I, +M) und dirigiert ähnlich wie -Cl oder -CH₂=CHNO₂ in *para*-Position.¹⁴⁸ Für die Reduktion der Carbonylfunktion wurde Natriumborhydrid in Methanol verwendet, das eine chemoselektive Hydridübertragung erlaubt und die Nitrofunktion nicht angreift.¹⁴⁹ Da 4'-Acetyl-4-nitrobiphenyl **196** prochiral ist, entstand bei dieser Reaktion das 4'-(1-Hydroxyethyl)-4-nitrobiphenyl **123** als racemisches Gemisch.

Abb. 39: Darstellung von 4'-(1-Hydroxyethyl)-4-nitrobiphenyl und 4'-Carboxy-4-nitrobiphenyl



4'-Acetyl-4-nitrobiphenyl **196** diente auch als Ausgangsmaterial für die Oxidation zu 4'-Carboxy-4-nitrobiphenyl **124** durch Haloformreaktion.¹⁵⁰

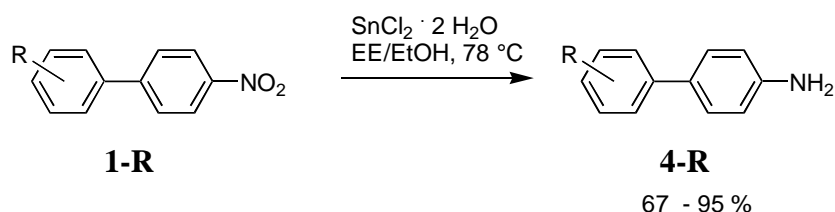
E.2.2.7 Darstellung der Alkyl-/CF₃-substituierten Amine durch Reduktion

Genau wie 4-Nitrobiphenyle sind auch substituierte 4-Aminobiphenyle durch Suzuki-Reaktionen zugänglich. Die direkte Kupplung von 4-Brom- oder 4-Iodanilin mit substituierten Boronsäuren verläuft allerdings häufig nur mit schlechten Ausbeuten (< 50 %). In der Regel kommt es nach einiger Zeit zum Ausfall von metallischem Palladium und die Reaktion bricht ab.¹⁵¹ Wahrscheinlich spielt eine Koordination des Amins an das Palladium hierbei eine Rolle. Außerdem entstehen bei solchen Umsetzungen desaminierte Produkte, deren Bildung

bisher nicht verstanden ist.²⁵⁵ Diese Nachteile können nur durch umständliche Schutzgruppenchemie verhindert werden (Schützen, Kuppeln, Entschützen).¹⁵²

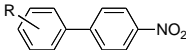
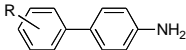
Wesentlich effizienter ist die Herstellung der Amine aus den entsprechenden Nitroverbindungen durch Reduktion (katalytische Hydrierung, Fe/HCl, Zinin-Reduktion, etc.)¹⁵³ In dieser Arbeit wurde ein Verfahren von Bellamy angewendet, bei dem Zinn(II)chlorid als Reduktionsmittel dient.²⁴⁵

Abb. 40: Darstellung substituierter 4-Aminobiphenyle durch Reduktion mit Zinn(II)chlorid



Mehrstündiges Refluxieren der Nitroaromaten in EE/EtOH (1:1) mit dem fünffachen Überschuß $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ergab die gewünschten Amine ohne Bildung von Nebenprodukten. Der genaue Mechanismus dieser Reaktion ist nicht geklärt. Eine Zusammenfassung der durchgeführten Reduktionen gibt Tabelle 10.

Tabelle 10: Reduktion der Alkyl-/CF₃-substituierten 4-Nitrobiphenyle

Eintrag	Edukt		Produkt		Ausbeute
1	4NBp	4	4ABp	4	95 %
2	4'Me-4NBp	94	4'Me-4ABp	111	90 %
3	4' <i>t</i> Bu-4NBp	97	4' <i>t</i> Bu-4ABp	116	87 %
4	3'Me-4NBp	99	3'Me-4ABp	112	88 %
5	3',5'DiMe-4NBp	100	3',5'DiMe-4ABp	113	92 %
6	4'CF ₃ -4NBp	126	4'CF ₃ -4ABp	130	85 %
7	3'CF ₃ -4NBp	127	3'CF ₃ -4ABp	131	65 %
8	3',5'DiCF ₃ -4NBp	128	3',5'DiCF ₃ -4ABp	132	67 %

Im Gegensatz zu den Nitroverbindungen sind die Amine oxidationsempfindlich, besonders diejenigen mit mehreren Alkylgruppen. Sie sollten deshalb im Eisschrank unter Argon gelagert werden.

E.2.3 Alkoxy-/Hydroxy-substituierte Verbindungen und Derivate

E.2.3.1 Darstellung der Alkoxy-substituierten 4-Nitrobiphenyle durch Kreuzkupp- lungen

4-Nitrobiphenyle mit Alkoxy substituenten (**1-OR**) können ebenfalls bequem durch Kupplungsreaktionen hergestellt werden. Die Synthese von 4'-Methoxy-4-nitrobiphenyl **140** und 4'-Ethoxy-4-nitrobiphenyl **145** erfolgte aus den entsprechenden Boronsäuren **171-OR** durch Standard-Suzuki-Kupplung, 4'-*tert*-Butoxy-4-nitrobiphenyl **147** wurde mit dem Eintopf-Verfahren (siehe E.2.2.1) erhalten.

Abb. 41: Herstellung von Alkoxy-substituierten 4-Nitrobiphenylen

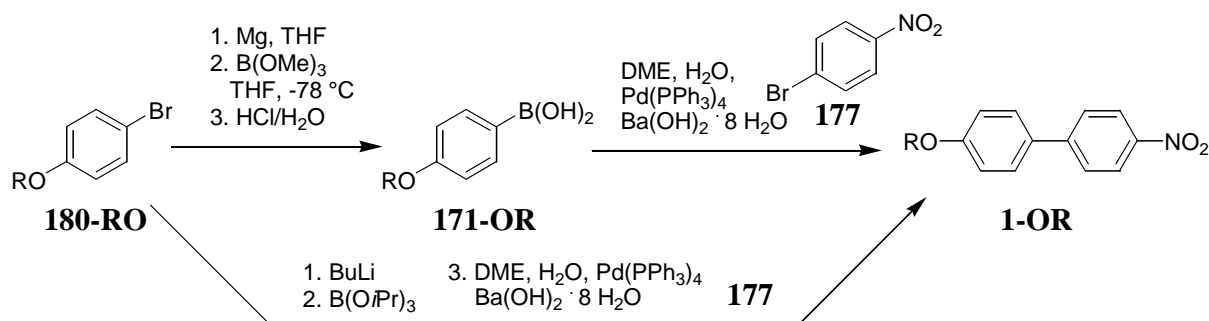


Tabelle 11: Ergebnisse der Suzuki-Kupplungen

Eintrag	Methode ^a	Produkt		Ausbeute ^b
1	A	4'MeO-4NBp	140	76 %
2	A	4'EtO-4NBp	145	73 %
3	B	4' <i>t</i> BuO-4NBp	147	85 %

^a Methode A: Pd(PPh₃)₄ (3 mol%), Boronsäure (1.1 Äquiv.), 4-Bromnitrobenzol (1.0 Äquiv.), Ba(OH)₂ (1.5 Äquiv.) in DME/Wasser bei 80 °C für 10 - 20 Stunden. Methode B: Eintopf-Verfahren, Boronester (1.2 Äquiv.), Pd(PPh₃)₄ (0.8 - 2.5 mol%), sonst wie Methode A. ^b Isolierte Ausbeute, bezogen auf 4-Bromnitrobenzol.

Bereits 1990 berichtete Amatore anhand der Synthese von 4-Methoxy-4-nitrobiphenyl **140**, daß auch die Negishi-Reaktion zur Darstellung von 4'-Alkoxy-4-nitrobiphenylen geeignet ist.¹⁵⁴ Negishi-Kupplungen, die im Vergleich zu Suzuki-Reaktionen etwas einfacher durchzuführen sind, dienten daher zur Herstellung aller weiteren 4'-Alkoxy-4-nitrobiphenyle. Beim ursprünglich publizierten Verfahren wurden allerdings ungewöhnlich große Mengen des vergleichsweise teuren Katalysators (10 mol%) eingesetzt. Da die bisherigen Kupplungsreaktionen gezeigt hatten, daß prinzipiell schon geringere Katalysatormengen gute Ausbeuten ergeben, wurden die Reaktionsbedingungen hier genauer analysiert. Dabei wurde der Einfluß

des Katalysators (Art, Menge) und der zweiten Kupplungskomponente untersucht. Die synthetisierten Verbindungen und die Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Abb. 42: Darstellung der 4'-Alkoxy-4-nitrobiphenyle durch Negishi-Kupplung

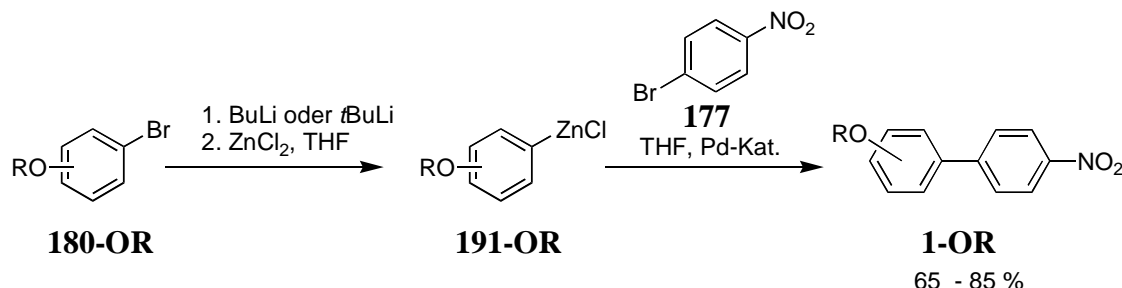


Tabelle 12: 4-Alkoxy-4-nitrobiphenyle durch Negishi-Kupplungen^a

Eintrag	X-	Katalysator	Produkt	1-OR	Ausbeute
1	-Br	Pd(PPh ₃) ₄ 10 %	4'MeO-4NBp	140	76 %
2	-Br	Pd(PPh ₃) ₄ 3 %	4' <i>n</i> BuO-4NBp	148	70 %
3	-Br	Pd(PPh ₃) ₄ 0.5 %	4' <i>n</i> BuO-4NBp	148	52 %
4	-I	Pd(OAc) ₂ /PPh ₃ 4 %	4' <i>n</i> BuO-4NBp	148	75 %
5	-I	Pd(dba) ₂ /TFP 3 %	4' <i>n</i> BuO-4NBp	148	82 %
6	-I	Pd(PPh ₃) ₄ 4 %	4'AdO-4NBp	150	81 %
7	-Br	Pd(PPh ₃) ₄ 2 %	4' <i>n</i> OctO-4NBp	149	81 %
8	-I	Pd(PPh ₃) ₄ 2 %	3' <i>t</i> Bu4'MeO-4NBp	144	90 %

^a Zinkaryl (1.2 Äquiv.), 4-Bromnitrobenzol/4-Iodnitrobenzol (1.0 Äquiv.), THF, RT, 8-20 Stunden.

Die Ergebnisse demonstrieren, daß die Menge des Katalysators ohne signifikante Ausbeuteverluste auf 2-3 mol% gesenkt werden konnte. Erst bei einer weiteren Verringerung auf 0.5 mol% ging der Umsatz deutlich zurück.ⁱ Alternativ ergab auch ein Katalysator, der *in situ* aus Pd(OAc)₂ und Triphenylphosphin oder aus Pd(dba)₂/TFP erzeugt worden war, gute Ausbeuten. In Analogie zu den Untersuchungen von Farina stieg die Kupplungsgeschwindigkeit bei Verwendung von TFP (Trifurylphosphin) als Ligand stark an, so daß die Reaktion schneller beendet war.¹⁵⁵ Als Kupplungspartner konnten sowohl 4-Bromnitrobenzol **177** als auch (das teurere) 4-Iodnitrobenzol **159** erfolgreich eingesetzt werden. Die Iodverbindung reagierte dabei jeweils schneller und lieferte in der Regel auch höhere Ausbeuten.

ⁱ Wichtig ist die Qualität des Katalysators. Pd(PPh₃)₄ ist luft- und lichtempfindlich und partiell oxidierte Chargen, die neben Triphenylphosphin auch Triphenylphosphinoxid enthalten, sind wesentlich weniger aktiv, erfordern längere Reaktionszeiten und geben niedrigere Ausbeuten.

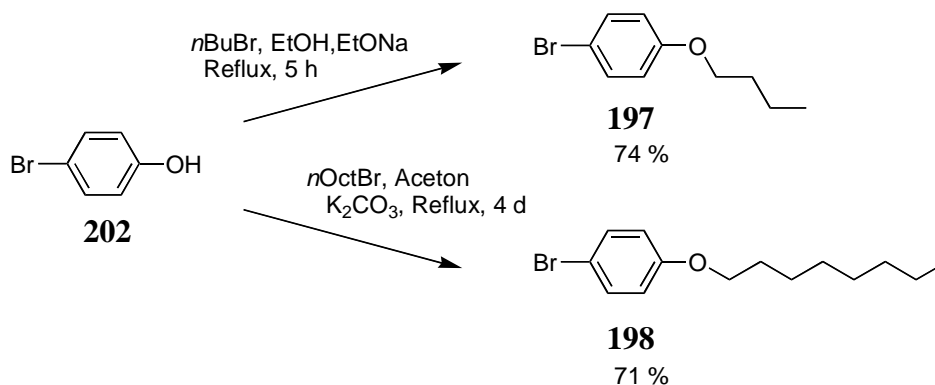
Die Art des Alkoxysubstituenten am Zinkaromaten scheint keinen wesentlichen Einfluß auf die Umsetzung zu haben. In allen Fällen bildeten sich außer dem Kreuzkupplungsprodukt und dem Homokupplungsprodukt (4,4'-Dialkoxybiphenyl, aus dem überschüssigen Zinkaryl) auch geringe Mengen anderer Nebenprodukte – wahrscheinlich durch Reduktion der Nitrogruppe durch das Zinkaryl, die z.T. nur schwierig säulenchromatographisch abzutrennen waren.

E.2.3.2 Darstellung der Edukte

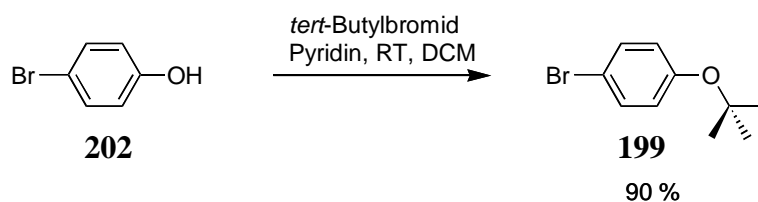
Die für die Herstellung der Zinkverbindungen **191-OR** eingesetzten Alkoxybrombenzole (4-Brom-*n*-butoxybenzol **197**, 4-Brom-*n*-octyloxybenzol **198**, 4-Brom-*tert*-butoxybenzol **199**, 4-(1-Adamantoxy)brombenzol **200** und 4-Brom-2-*tert*-butylanisol **201**) waren kommerziell nicht erhältlich und mußten synthetisiert werden.

4-Brom-*n*-butoxybenzol **197** und 4-Brom-*n*-octyloxybenzol **198** wurden durch O-Alkylierung von 4-Bromphenol **202** mit *n*-Butylbromid durch Williamsche Ethersynthese²⁵⁴ bzw. mit *n*-Octylbromid in Aceton mit Kaliumcarbonat als Base nach einem Verfahren von Allen²⁵¹ in guten Ausbeuten erhalten.

Abb. 43: 4-Brom-*n*-butoxybenzol und 4-Brom-*n*-octyloxybenzol

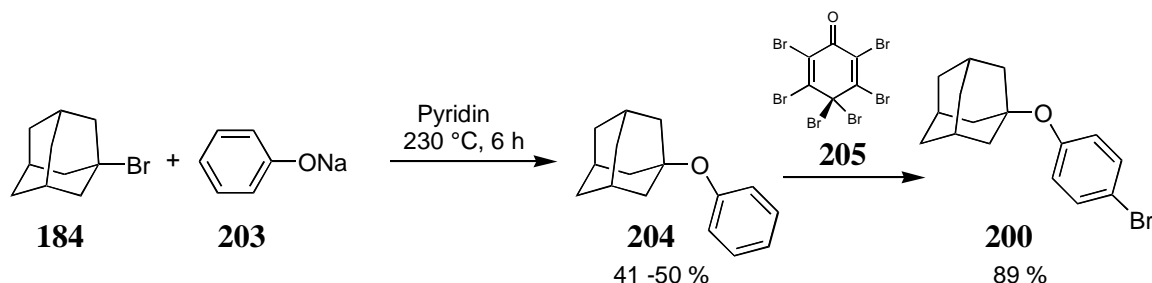


Tertiäre Ether wie 4-Brom-*tert*-butoxybenzol **199** (Abb. 44) lassen sich mit diesen Methoden dagegen nicht oder nur in schlechter Ausbeute erhalten, da die stark basischen Bedingungen und hohen Temperaturen hauptsächlich zur Eliminierung führen. In Anlehnung an eine viel mildere Methode von Masada wurde *tert*-Butylbromid daher in Gegenwart von Pyridin als Base mit einem fünffachen Überschuß von 4-Bromphenol **202** in DCM bei 0 °C (später RT) umgesetzt und ergab den Ether **199** in 90 % Ausbeute.²⁵²

Abb. 44: Darstellung von 4-Brom-*tert*-butoxybenzol

Im Gegensatz zu 4-(1-Adamantoxy)chlorbenzol, das Kraatz erstmals in niedriger Ausbeute (27 %) durch DCC-katalysierte Veretherung von 4-Chlorphenol und 1-Hydroxyadamantan hergestellt hat,¹⁵⁶ war 4-(1-Adamantoxy)brombenzol **200** in der Literatur bisher unbekannt. Einen praktikablen Zugangsweg bot eine Synthesesequenz, bei der zuerst 1-Adamantylphenylether **204** hergestellt wurde und man anschließend selektiv in *para*-Position zu **200** bromierte. Die Herstellung von 1-Adamantylphenylether **204** war aufwendig. Nukleophile Substitutionen am Brückenkopfatom des Adamantylsystems können nur nach einem S_N1-Mechanismus ablaufen, da ein Rückseitenangriff aufgrund der Gerüststruktur nicht möglich ist. Das Gerüst verhindert ebenfalls, daß sich ein planares und damit durch Hyperkonjugation stabilisiertes Carbeniumion bilden kann. 1-Adamantylcarbeniumionen sind daher sehr energiereich und 1-Adamantylhalogenide werden bei nukleophilen Substitutionen nur langsam umgesetzt.¹⁵⁷ Tatsächlich reagierte 1-Bromadamantan **184** unter den Bedingungen der Williamsche Ethersynthese überhaupt nicht zum Ether, sondern es kam ausschließlich zur Kernalkylierung. Erst unter den wesentlich drastischeren Bedingungen, die Novikov beschrieben hat, wurde Etherbildung in bis zu 50 % Ausbeute beobachtet.²⁵⁶ 1-Bromadamantan **184** wurde dabei mit überschüssigem Natriumphenolat **203** in Gegenwart von Pyridin bei 230 °C umgesetzt.

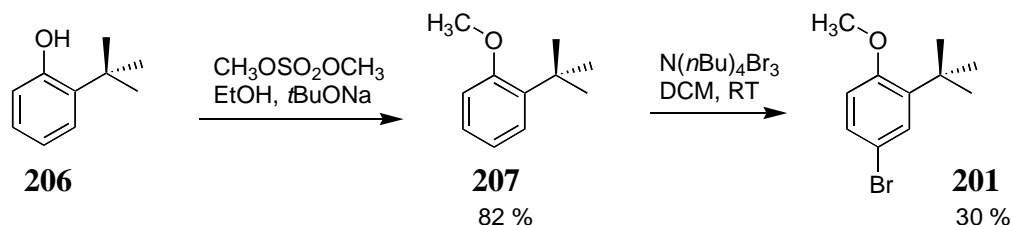
Abb. 45: Darstellung von 4-(1-Adamantoxy)brombenzol



Für die anschließende selektive Bromierung des Ethers mußte ein *para*-selektives Bromierungsmittel eingesetzt werden, da die Verwendung von Brom in DCM bei 0 °C trotz des sterischen Anspruchs der Adamantoxygruppe ein Produktgemisch ergab. Sehr gute Ergebnisse lieferte das Bromierungsreagenz 2,4,4,6-Tetrabrom-cyclohexa-2,5-dienon²⁵⁷ **205**.

Zur Synthese von 4-Brom-2-*tert*-butylanisol **201** wurde 2-*tert*-Butylphenol **206** mit Dimethylsulfat zu **207** verethert und mit Tetrabutylammoniumtribromid bei RT umgesetzt. Trotz langer Reaktionszeit erhielt man bei dieser Bromierungsmethode das gewünschte Produkt **201** nur in mäßiger Ausbeute und ein Großteil des Edukts wurde unverändert zurückgewonnen.

Abb. 46: Darstellung von 4-Brom-2-*tert*-butylanisol

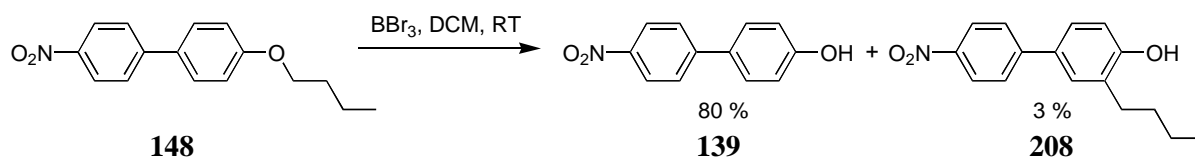


Tetrabutylammoniumtribromid wird normalerweise zur selektiven *para*-Bromierung von Anilinen benutzt, da es nicht toxisch ist, besser als Brom dosiert werden kann und keine polybromierten Produkte entstehen.²⁵⁹ Für die Bromierung von Phenolethern ist es offensichtlich zu wenig reaktiv.ⁱ

E.2.3.3 Darstellung von 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl und Derivaten

4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** kann aufgrund der aziden Hydroxygruppe nicht direkt durch Negishi-Reaktion hergestellt werden. Aus 4'-Alkoxy-4-nitrobiphenylen wie beispielsweise 4-*n*-Butoxy-4-nitrobiphenyl **148** war 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** durch Etherspaltung mit BBr_3 in DCM in guter Ausbeute zugänglich.

Abb. 47: Etherspaltung von 4'-*n*-Butoxy-4-nitrobiphenyl



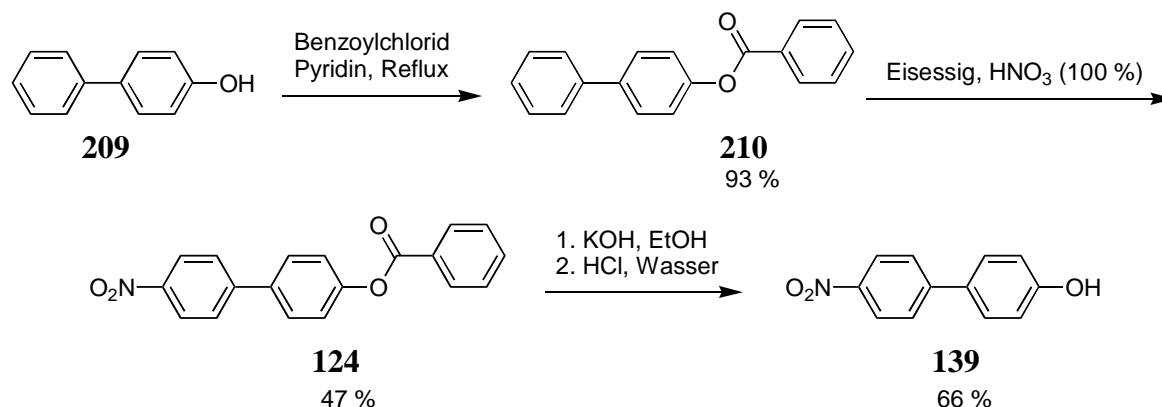
Bei dieser Reaktion bildete sich allerdings ein Nebenprodukt in geringer Menge ($\sim 3\%$), das weder durch Säulenchromatographie noch durch Umkristallisieren vollständig entfernt werden konnte. Nach GC-MS Analyse handelt es sich dabei möglicherweise um 3'-Butyl-4'-hydroxy-4-nitrobiphenyl **208**, das in Gegenwart der Lewisäure BBr_3 durch [1,3]-Alkyl-Verschiebungⁱⁱ entstanden sein könnte.

ⁱ Die Verwendung von 2,4,4,6-Tetrabromcyclohexa-2,5-dienon **205** ergäbe wahrscheinlich wesentlich höhere Ausbeuten.

ⁱⁱ Analog zur Fries-Verschiebung, bei der Acyl-Gruppen umgelagert werden.

Um eine saubere Probe für den Ames-Test zu erhalten, wurde daher auf ein etabliertes Verfahren von Jones²⁴⁷ zurückgegriffen, das sich nach folgender Reaktionssequenz auch in größerem Maßstab (~ 60 mmol) gut durchführen ließ.

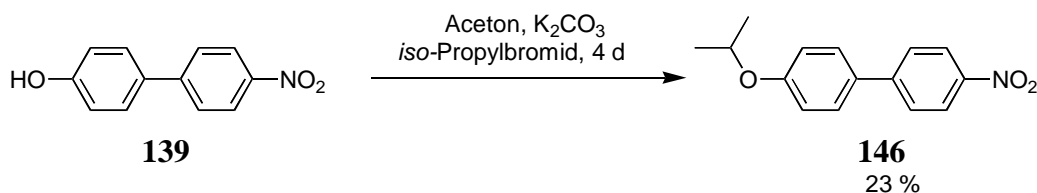
Abb. 48: Darstellung von 4-Hydroxy-4-nitrobiphenyl



4-Hydroxybiphenyl **209** wurde nach der Einhorn-Variante¹⁵⁸ mit Benzoylchlorid in den Ester **210** überführt und mit rauchender Salpetersäure in Eisessig nitriert. Neben dem Hauptprodukt **124**, das in der Nitriermischung schwerlöslich ist und ausfällt, bildete sich auch das 2'-Isomerⁱ (zu etwa 25 %), das viel besser löslich ist und kaum ausfällt. Hydrolyse des umkristallisierten Esters **124** mit KOH lieferte das Kaliumsalz (tiefblaue Kristalle), das mit Salzsäure ins freie 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** überführt wurde. Die direkte Nitrierung von 4-Hydroxybiphenyl **209** oder von dessen Acetylestern eignete sich dagegen nicht zur Darstellung von 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139**. Der Essigester wird unter den Reaktionsbedingungen hydrolysiert, so daß die Nitrogruppe nur in *ortho*-Position zur Hydroxygruppe eingeführt wurde.¹⁵⁹ Der Trick des Verfahrens von Jones besteht also darin, durch die Bildung des Benzoesäureesters, der bei der Nitrierung stabil ist, den aktivierenden Einfluß der Hydroxygruppe zu reduzieren und die Nitrierung in den zweiten Phenylring zu lenken.

Zusätzlich zu den bereits vorgestellten 4'-Alkoxy-4-nitrobiphenylen (Tabelle 12) wurde für den Ames-Test noch 4'-*iso*-Propoxy-4-nitrobiphenyl **146** benötigt. Dieses sollte nach dem bereits erwähnten Verfahren von Allen²⁵¹ durch Alkylierung von 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** synthetisiert werden, das in nun hoher Reinheit zur Verfügung stand. Im Gegensatz zu substituierten Phenolen (wie 4-Bromphenol **202**), bei denen dieses Verfahren im allgemeinen sehr gute Ergebnisse liefert, wurde 4'-*iso*-Propoxy-4-nitrobiphenyl **146** trotz verlängerter Reaktionszeit (4 Tage) nur in geringer Ausbeute (23 %) gebildet. Das verbliebene Edukt **139** wurde unverändert zurückgewonnen.

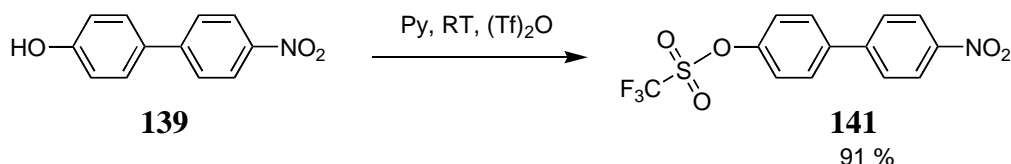
ⁱ 2'-Nitrobiphenyle sind im Ames-Test nicht mutagen.

Abb. 49: Darstellung von **146** durch O-Alkylierung von **139**

Das Hauptproblem dieser Reaktion stellt die sehr schlechte Löslichkeit des Edukts in Aceton darⁱ, so daß die Reaktionsgeschwindigkeit stark herabgesetzt ist. Nach Untersuchungen von Gage über N-Alkylierungen von Aminen, bei denen z. T. ähnliche Probleme auftreten,¹⁶⁰ sollte die Verwendung von Dioxan oder DME als Lösungsmittel bei höheren Temperaturen im Überdruckbehälter (2-Brompropan siedet bei 59 °C) zu wesentlich besseren Ausbeuten führen. Leslie hat für ähnliche Veretherungen THF und 18-Krone-6 verwendet, aber keine Ausbeuten angegeben.¹⁶¹

Ausgehend von 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **140** wurde auch ein entsprechendes Triflat **141** synthetisiert, das in der Literatur bisher nicht beschrieben worden ist. Dieses war nach einem Standard-Protokoll durch Veresterung von **139** mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Tf)₂O in hoher Ausbeute zugänglich.

Abb. 50: Darstellung von 4'-(Trifluormethyl)sulfonyloxy-4-nitrobiphenyl



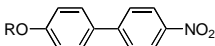
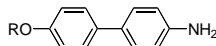
4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** und alle 4'-Alkoxy-4-nitrobiphenyle (**140**, **144** - **150**) sind hellgelbe kristalline Verbindungen, die – mit Ausnahme von **139** – aufgrund ihrer höheren Hydrophilie im Vergleich zu den Alkyl-substituierten Derivaten in den gängigen Lösungsmitteln besser löslich sind. Nur das Triflat ist farblos, da die Einführung der Trifluormethansulfonsäuregruppe aus der elektronenschiebenden Hydroxyfunktion (+I, +M) einen Elektronenakzeptor macht. Dadurch wird der Energieunterschied zwischen HOMO und LUMO angehoben und die Verbindung absorbiert nicht mehr im sichtbaren Bereich.

ⁱ 4-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** löst sich auch in vielen anderen Lösungsmitteln (Ether, Essigester, PE, DCM, Chloroform) schlecht. Besser ist die Löslichkeit in siedendem Ethanol oder Dioxan.

E.2.3.4 Darstellung der Alkoxy-substituierten Amine durch Reduktion

Zur Synthese der 4'-Alkoxy-4-aminobiphenyle wurde auf die Reduktion mit Zinn(II)chlorid zurückgegriffen (vgl. E.2.2.7).

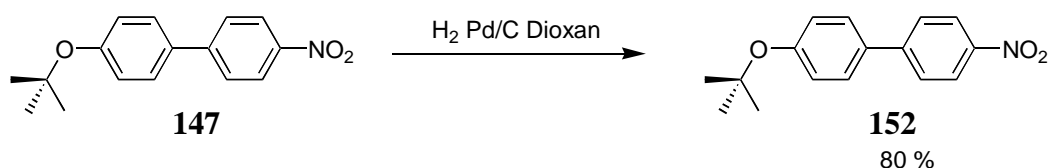
Tabelle 13: Reduktion der 4'-alkoxysubstituierten 4-Nitrobiphenyle

Eintrag	Edukt		Produkt		Ausbeute
1	4'MeO-4NBp	140	4'MeO-4ABp	151	80 %
2	4'EtO-4NBp	145	4'EtO-4ABp	211	75 %
3	4' <i>n</i> BuO-4NBp	148	4' <i>n</i> BuO-4ABp	212	80 %
4	4' <i>t</i> BuO-4NBp	147	4' <i>t</i> BuO-4ABp	152	< 30 % ^a
5	4' <i>n</i> OctO-4NBp	149	4' <i>n</i> OctO-4ABp	213	72 %

^a Ausbeute aus ¹H-NMR des Rohprodukts.

Bei fast allen Reduktionen erhielt man die Amine in guten Ausbeuten. Einzige Ausnahme war die *tert*-Butoxy-Verbindung **152**. Hier bildeten sich statt des gewünschtenamins hauptsächlich 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** und etwas 4'-Hydroxy-4-aminobiphenyl. Obwohl hydriertes Zinn(II)chlorid nur eine schwache Lewisäure ist, reichte sie aus, um den tertiären Ether zu spalten. Überhaupt scheint 4'-*tert*-Butoxy-4-nitrobiphenyl **152** bei extremen pH-Werten recht labil zu sein, denn auch im basischen wurde langsame Etherspaltung beobachtet. 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** und seine deprotonierte Form stellen also gute Austrittsgruppen dar. Palladium-katalysierte Hydrierung unter neutralen Bedingungen mit Palladium/Kohle lieferte das Amin dagegen ohne Bildung von Nebenprodukten.

Abb. 51: Hydrierung von 4'-*tert*-Butoxy-4-nitrobiphenyl



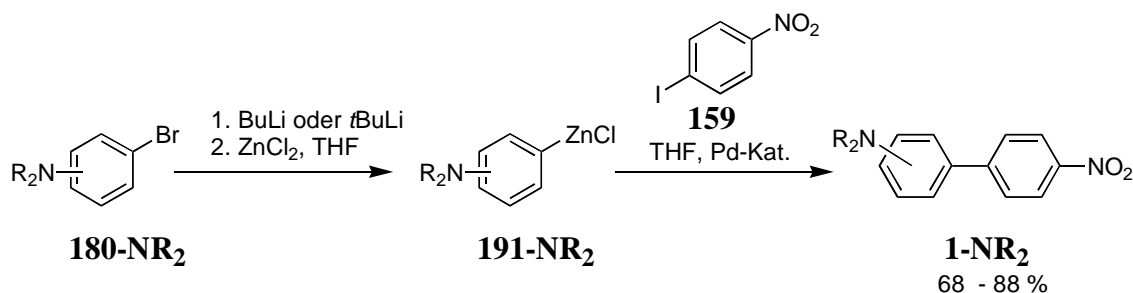
Alle 4'-Alkoxy-4-aminobiphenyle sind oxidationsempfindlich – besonders in Lösung – und färben sich schnell braun.

E.2.4 N,N-Dialkyl/Amino-substituierte Verbindungen und Derivate

E.2.4.1 Darstellung der N,N-Dialkyl-substituierten 4-Nitrobiphenyle durch Kupplungen

Zur Darstellung der N,N-dialkylierten 4'-Amino-4-nitrobiphenyle (Alkyl = Me, Et, *i*Pr) wurde im wesentlichen auf die bereits beschriebenen Strategien zurückgegriffen, also die Verknüpfung der Phenyleinheiten durch Kreuzkupplung. In Anlehnung an das Verfahren von Amatore¹⁵⁴ wurden die *para*-bromierten N,N-Dialkylaminobenzole **180-NR₂** durch Halogen-Metall-Austausch lithiiert, mit ZnCl₂ zu **191-NR₂** transmetalliert und Palladium-katalysiert mit 4-Iodnitrobenzol **159** gekuppelt.

Abb. 52: Darstellung der N,N-Dialkyl-4'-amino-4-nitrobiphenyle durch Negishi-Kupplung



Ähnlich wie bei den Alkoxyverbindungen erhielt man schon mit wesentlich geringeren Katalysatormengen als ursprünglich in der Literatur beschrieben (2-3 mol% statt 10 mol%) gute Ausbeuten an Kupplungsprodukt (Tabelle 14). Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit in Lösungsgemischen aus EE/PE oder DCM/PE war die Feinreinigung allerdings schwierig. Um saubere Proben zu erhalten, mußten die Verbindungen **154** - **156** in mehrfach chromatographiert werden.

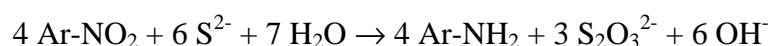
Tabelle 14: N,N-Dialkyl-4'-amino-4-nitrobiphenyle durch Negishi-Kupplung

Eintrag	Katalysator	Produkt	Ausbeute
1	Pd(PPh ₃) ₄ 2 %	4'-N,N-DiMe-4NBp 154	68 %
2	Pd(PPh ₃) ₄ 3 %	4'-N,N-DiEt-4NBp 155	88 %
3	Pd(dba) ₂ /TFP 2.5 %	4'-N,N-Di <i>i</i> Pr-4NBp 156	82 %

Im Gegensatz zu den alkylierten Verbindungen ist das unsubstituierte 4'-Amino-4-nitrobiphenyl **153** durch direkte Kreuzkupplung nur schlecht zugänglich. Abgesehen davon, daß Amine bei Palladium-katalysierten Reaktionen häufig stören (vgl. E.2.2.7), würden hier

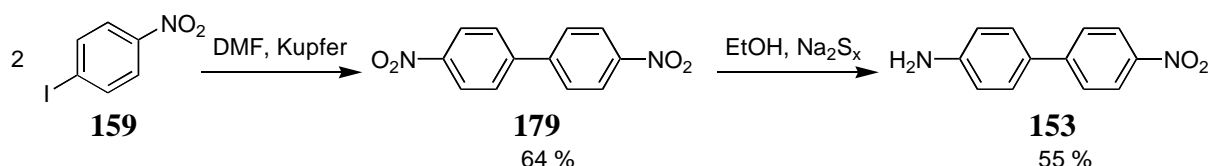
Kupplungskomponenten benötigt, die am Phenylring gleichzeitig einen Metall- und einen *para*-Nitro- bzw. *para*-Amino-Substituenten tragen. Bei Zinkarlenen sind diese Kombinationen bisher unbekannt, bei Boronsäuren nur schwierig zu realisieren.¹⁷⁵

Viel einfacher gelang die Synthese von **153** durch die selektive Reduktion einer Nitrofunktionalität von 4',4-Dinitrobiphenyl **179** nach einem Verfahren von Cade.²⁶³ Für solche Reduktionen hat sich die Zinin-Reduktion¹⁶² bewährt, bei der man Polysulfide in alkalischer Lösung als Reduktionsmittel verwendet. Der Vorteil gegenüber anderen Methoden besteht in dem vergleichsweise niedrigen Reduktionspotential des Polysulfids, das die Unterscheidung von Nitrogruppen in wenig unterschiedlicher Umgebung erlaubt.ⁱ Der Mechanismus ist nur teilweise verstanden. Die Stöchiometrie wird wie folgt angegeben:¹⁶²



Das Ausgangsmaterial 4',4-Dinitrobiphenyl **179** wurde durch eine leicht abgewandelte Variante der Ullmann-Reaktion dargestellt. Dazu wurde 4-Iodnitrobenzol in DMF mit Kupferbronze und etwas Palladiumacetat einige Stunden refluxiert.ⁱⁱ Man geht davon aus, daß dabei intermediär durch Halogen-Metall-Austausch eine Arylkupfer(I)-Verbindung entsteht, an die sich der zweite Halogenaromat oxidativ addiert. Durch reduktive Eliminierung wird das Biphenyl freigesetzt.¹⁶³

Abb. 53: Darstellung von 4'-Amino-4-nitrobiphenyl



E.2.4.2 Darstellung der Edukte

Ähnlich wie bei den Alkoxyderivaten mußten die für die Darstellung von **155** und **156** benötigten 4-Brom-N,N-dialkylaniline synthetisiert werden, da nur 4-Brom-N,N-dimethylanilin kommerziell erhältlich war.

ⁱ z.B. kann 1,3-Dinitrobenzol selektiv zur 3-Nitroanilin reduziert werden.

ⁱⁱ In der Originalvorschrift wird kein Lösungsmittel verwendet und bei 220 °C gearbeitet. Ohne Lösungsmittel sublimierte ein Teil des 4-Iodnitrobenzols aus der Reaktionsmischung und wurde dadurch der Reaktion entzogen. Andererseits hat die Verwendung von DMF den Nachteil, daß es anscheinend die Deiodierung zu Nitrobenzol, das als Nebenprodukt nachgewiesen wurde, begünstigt. Das zugegebene Palladium sollte als Katalysator fungieren, da es leichter als Kupfer in Halogen-Arylbindungen inseriert werden kann.

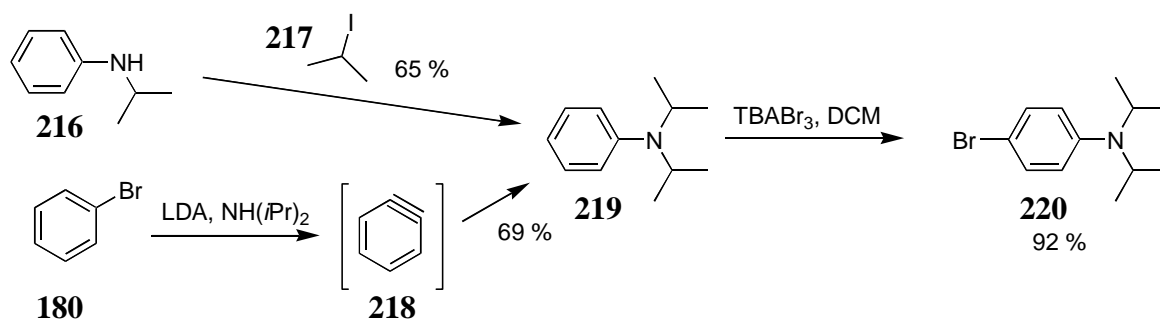
Die Bromierung von N,N-Diethylanilin **214** mit TBABr₃ nach einer Vorschrift von Berthelot ergab 4-Brom-N,N-diethylanilin **215** in sehr guter Ausbeute und Regioselektivität (~ 3 % *ortho*-Verbindung als Nebenprodukt nach ¹H-NMR).

Abb. 54: Bromierung von N,N-Diethylanilin



Für die analoge Reaktion mit der *iso*-Propyl-Verbindung wurde N,N-Di-*iso*-propylanilin **219** benötigt, dessen Darstellung sich als relativ schwierig erwies. Die Alkylierung von Anilin durch tagelanges Refluxieren in einem Gemisch aus überschüssigem *iso*-Propylbromid und 2-Propanol lieferte nämlich nur das monoalkylierte Produkt **216**, obwohl nach Literaturangaben unter diesen Bedingungen auch die Dialkylverbindung hätte entstehen müssen.¹⁶⁴ Offensichtlich ist aus sterischen Gründen die Einführung der zweiten *iso*-Propylgruppe erschwert und erfolgt daher viel langsamer. Bei Erhöhung der Nukleophilie des Anilins durch stärker basische Bedingungen kam es hauptsächlich zur Eliminierung. Erst das Verfahren von Zander¹⁶⁵ – Refluxieren von N-*iso*-Propylanilin in überschüssigem, reinem *iso*-Propyliodid **217** – lieferte das gewünschte Produkt in guter Ausbeute. Alternativ wurde N,N-Di-*iso*-propylanilin **219** auch aus Brombenzol **180** und LDA in Di-*iso*-propylamin hergestellt. Hierbei wird ein Arin-Mechanismus über **218** durchlaufen.

Abb. 55: Darstellung von N,N-Di-*iso*-propyl-4-bromanilin



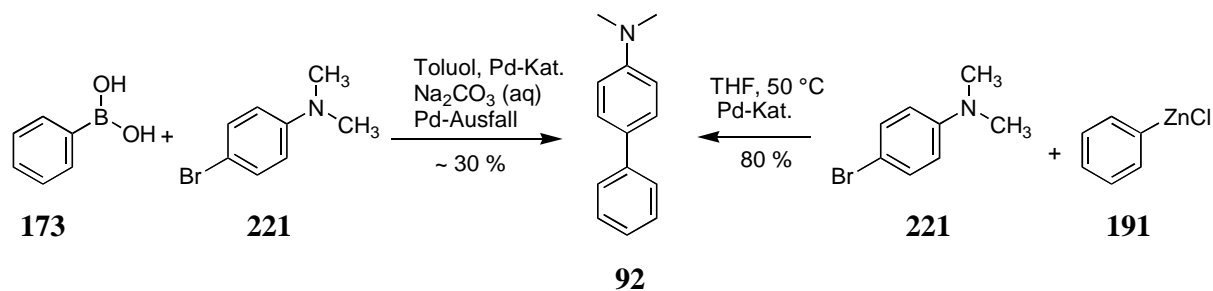
In der Literatur ist die Darstellung von 4-Brom-N,N-di-*iso*-propylanilin **220** bisher nur durch direkte Bromierung in Eisessig bei 10 - 15 °C beschrieben worden, die nur geringe Ausbeuten liefert (42 %).¹⁶⁶ Die Bromierung mit TBABr₃ ergab das gewünschte Produkt dagegen in nahezu quantitativer Ausbeute.

E.2.4.3 Darstellung von Derivaten mit modifizierter funktioneller Gruppe

Die Darstellung von N,N-Dimethyl-4-aminobiphenyl **91** durch Umsetzung von 4-Aminobiphenyl **1** mit Dimethylsulfat und wäßriger Karbonatlösung wurde von Hoffmann bereits 1925 durchgeführt, allerdings ohne Angabe der Ausbeute.¹⁶⁷ Von analogen Alkylierungen dieses Typs ist allerdings bekannt, daß sie wegen des elektronenschiebenden Effekts der Alkylreste nur schlecht zu kontrollieren sind, Produktgemische liefern und daher ohne Optimierung niedrige Ausbeuten ergeben. So entstehen bei einem Überschuß an Alkylierungsmittel neben der dialkylierten Spezies auch die Trimethylarylammoniumsalze. Die bewährten Kupplungsreaktionen, bei denen käufliches 4-Brom-N,N-dimethylanilin **221** eingesetzt werden kann, umgehen diese Probleme.

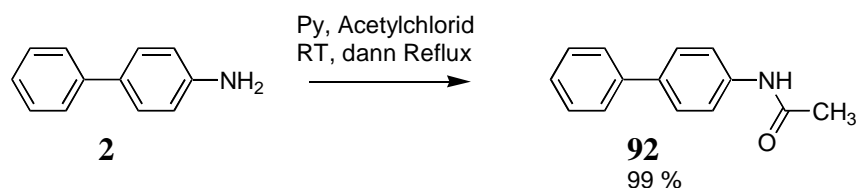
Völlig unerwartet führte die Suzuki-Reaktion von 4-Brom-N,N-dimethylanilin **221** und Phenylboronsäure **171** allerdings bereits nach kurzer Zeit zum Ausfall von Palladium und damit zum Abbruch der Kupplung. Ein ganz ähnliches Resultat war bei derselben Umsetzung – wie sich später herausstellte – auch von Brandsma beobachtet worden.¹⁶⁸ Die Ursache dieses Phänomens, das man sonst nur von Kupplungen mit freien Aminen kennt, ist bisher unklar. Wahrscheinlich spielt auch hier die leichte Oxidierbarkeit der N,N-Dimethylaminogruppe und ihre Wirkung als Ligand eine Rolle.

Abb. 56: Darstellung von N,N-Dimethyl-4-aminobiphenyl **92**



Interessanterweise trat dieses Problem bei der Negishi-Kupplung nicht auf. Es kam zwar auch hier zum Ausfall von Palladium, jedoch erst nach Beendigung der Reaktion, so daß das Kupplungsprodukt in hoher Ausbeute isoliert werden konnte.

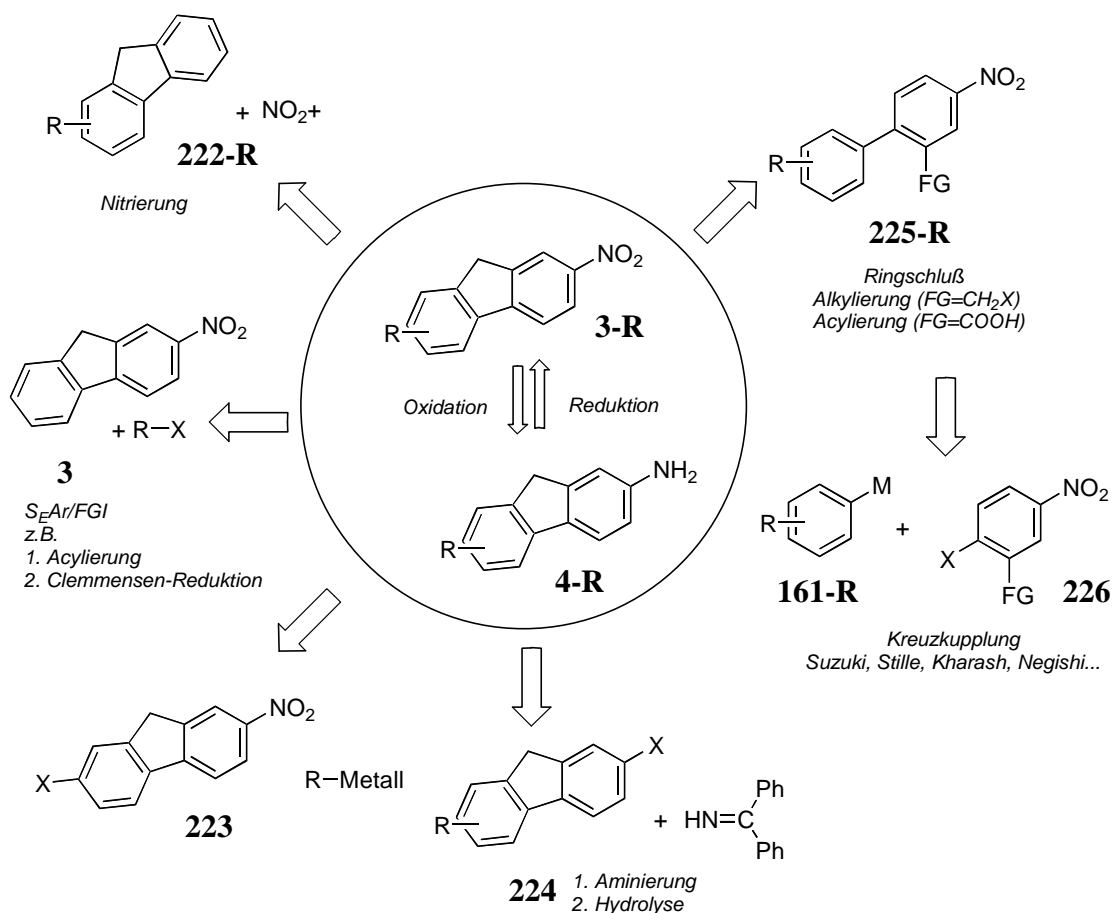
Als weiteres Derivat wurde N-Acetyl-4-aminobiphenyl **93** durch Acetylierung von **2** unter Standardbedingungen erhalten (Abb. 57).

Abb. 57: Acetylierung von 4-Aminobiphenyl **2**

E.3 2-Nitro-/2-Aminofluorene

Für die Mutagenitätsuntersuchungen wurden neben den Biphenylderivaten auch 2-Nitro-/2-Aminofluorene mit unterschiedlich großen Alkylresten bzw. mit CF₃-Substituenten benötigt. Auch für die Herstellung solcher Verbindungen stehen eine Vielzahl von Synthesestrategien zur Verfügung, eine Auswahl davon zeigt Abb. 58. Aufgrund der geringeren Symmetrie im Fluoren können bei der direkten Einführung von Substituenten an den Grundkörper allerdings mehr Strukturisomere entstehen als beim Biphenyl.

Abb. 58: Retrosynthese von Nitro-/Aminofluorenen



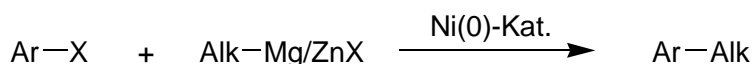
Von den zahlreichen retrosynthetischen Ansätzen ist die Nitrierung von substituierten Fluoren des Typs **222-R** am häufigsten zur Darstellung der Zielmoleküle **3-R** und **4-R** angewen-

det worden.ⁱ Die ersten 7-Alkyl-substituierten Derivate von 2-Nitrofluoren wurden beispielsweise 1953 von Sawicki durch Nitrierung von 2-Methyl- bzw. 2-Ethylfluoren synthetisiert.¹⁶⁹ Die Einführung der Nitrogruppe erfolgt bei dieser Reaktion überwiegend in der 2-Position. Die in geringen Mengen anfallenden anderen Isomere können aufgrund der guten Kristallisationseigenschaften der Nitrofluorene einfach abgetrennt werden. Die als Ausgangsstoffe benötigten 2-Alkylfluorene **222-R** (R = Alkyl) sind durch Friedel-Crafts-Alkylierung von Fluoren grundsätzlich zwar ebenfalls leicht zugänglich, jedoch nicht in reiner Form. Da solche Alkylierungsreaktionen nicht regioselektiv verlaufen und die Alkylgruppen die Reaktivität des Aromaten erhöhen, erhält man außer der gewünschten Verbindung noch andere Regioisomere und mehrfach alkylierte Produkte. So wurden bei der *tert*-Butylierung von Fluoren bis zu acht verschiedene Produkte (darunter Mono-, Di-, Tri- und Tetra-*tert*-butylfluorene) in wechselnden Ausbeuten (je nach Katalysator, Lösungsmittel, Temperatur und Reaktionszeit) gefunden. Die maximal erreichte Ausbeute von 2-*tert*-Butylfluoren betrug 43 %.¹⁷⁰ Ähnliche Ergebnisse sind von anderen Alkylierungen am Fluoren bekannt.¹⁷¹ Die Auftrennung der Reaktionsgemische ist bei größeren Ansätzen ausgesprochen aufwendig und gelingt häufig nicht vollständig.ⁱⁱ

Besser können 2-Alkylfluorene durch zweistufige Sequenzen aus Friedel-Crafts-Acylierung und Clemmensen-Reduktion hergestellt werden. Dieses Verfahren ist aber nur für manche Alkylverbindungen geeignet und kann beispielsweise zur Synthese der hier benötigten *tert*-Butyl- oder Adamantyl-derivate nicht verwendet werden.

E.3.1 Darstellung von 2-Alkylfluoren durch Aryl-Alkyl-Kupplung

Einen möglichen anderen Zugangsweg zu 2-Alkylfluoren bot ein Methode von Tamao, bei der Arylhalogenide Nickel-katalysiert mit Alkylgrignardverbindungen (im Überschuß) in Ether gekuppelt werden. Man verwendet hierbei meist Arylchloride, je nach eingesetztem Katalysator geben aber auch Arylbromide oder -iodide gute Ausbeuten.¹⁷² Als Kupplungspartner sind primäre, sekundäre und tertiäre Grignard-Reagenzien einsetzbar, letztere allerdings nur eingeschränkt, da es häufig zu Umlagerungen kommt.¹⁷³

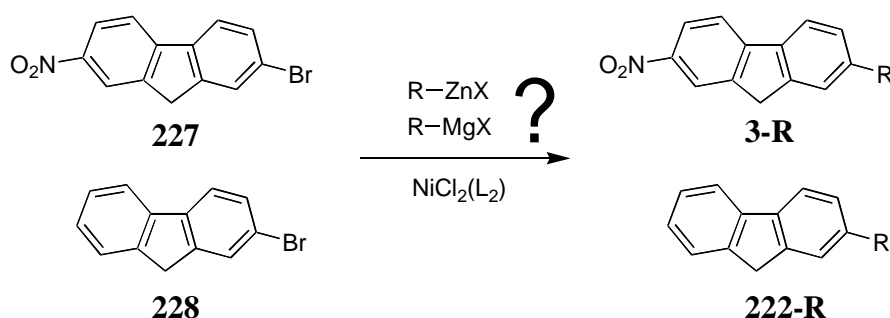


ⁱ Aminierungsreaktionen sind dagegen noch nie an Fluorensystemen durchgeführt worden. Auch nukleophile Substitutionen an elektronenarmen Fluoren sind weitgehend unerforscht.

ⁱⁱ In einer Testreaktion wurde Fluoren mit Cyclohexanol und BF₃-Etherat alkyliert. Bei dieser Reaktion bildeten sich zahlreiche Produkte (GC-Analyse des Destillats nach Aufarbeitung), die nicht vollständig getrennt wurden.

Auch Zink-Alkyl-Verbindungen können mit Arylhalogeniden gekuppelt werden und tolerieren dabei zahlreiche funktionelle Gruppen.¹⁷⁴ Mechanistisch ähnelt diese Reaktion den in Abschnitt E.2.1 beschriebenen Aryl-Aryl'-Kreuzkupplungen. Da 2-Bromfluoren **228** und 2-Brom-7-nitrofluoren **227** isomerenrein kommerziell erhältlich waren, wurde untersucht, ob 2-Alkylfluorene **222-R** bzw. 2-Nitro-7-alkylfluorene **3-R** auf diese Weise direkt hergestellt werden können.

Abb. 59: Mögliche Synthese von 2-Alkylfluorenen


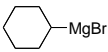
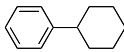

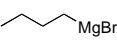
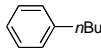
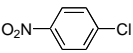
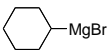
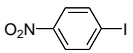
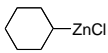
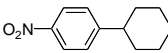
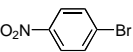

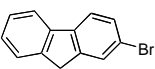
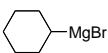
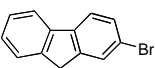
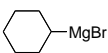
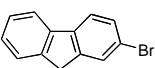
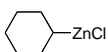


Vor der Umsetzung von **228** oder **227** wurden eine Reihe von Testreaktionen durchgeführt. Eine Auflistung der Kupplungsversuche gibt Tabelle 15.

Tatsächlich funktionierten die publizierten Kupplungen der metallorganischen Reagenzien **231** und **232** mit den Substraten **229** und **180** (Einträge **1** und **2**) sehr gut. Die zusätzliche Nitrogruppe wurde nur durch die weniger reaktive Zinkverbindung, die aus der Grignardverbindung durch Transmetallierung zugänglich war, toleriert und erlaubte bei Verwendung von 4-Iodnitrobenzol **159** die Isolierung des Kupplungsprodukts ohne Optimierung der Reaktionsbedingungen immerhin in 30 % Ausbeute (Eintrag **4**). Die Magnesiumverbindung ergab ein Gemisch, das nur wenig Kupplungsprodukt enthielt. Mit dem weniger reaktiven 4-Bromnitrobenzol **177** wurde dagegen gar keine Kupplung beobachtet. Auch 2-Bromfluoren **228** als Substrat konnte nach dieser Methode mit keinem der beiden metallorganischen Reagenzien **231** und **233** verknüpft werden. Statt des Kupplungsprodukts wurde nur debromiertes Fluorenⁱ und unverändertes **228** zurückgewonnen (Einträge **6 - 8**). Dies ist ein Zeichen dafür, daß die oxidative Addition des 2-Bromfluorens **228** an den Katalysator zu langsam erfolgt. Dieser wenig erfolgreiche Ansatz wurde nicht weiter verfolgt.

ⁱ Durch Halogen-Metall-Austausch bildet sich wahrscheinlich die Arylmagnesiumspezies, aus der bei der Aufarbeitung das Fluoren freigesetzt wird.

Tabelle 15: Nickel-katalysierte Kupplung von Alkyl-MgX/ZnX mit Arylhalogeniden

Eintrag	Arylhalogenid	Alkyl-Metall-Vb.	Kat./Zeit (h)	Produkte	Ausbeute (Lit. ¹⁷²)
1	 229	 231^b	NiCl ₂ (dppp) / 68	 235	95 % (97 %)
2	 180	 232	NiCl ₂ (dppp) / 9	 236	65 % (54 %)
3	 230	 231	NiCl ₂ (dppp) / 3	Gemisch	~ 5 %
4	 159	 233	NiCl ₂ (dppp) / 12	 237	~ 30 %
5	 177	 234	NiCl ₂ (dppf) / 12	kein Umsatz ^c	-
6	 228	 231	NiCl ₂ (dppp) / 15	228 / Fluoren ^a	-
7	 228	 231	NiCl ₂ (dppe) / 13	228 / Fluoren ^a	-
8	 228	 233	NiCl ₂ (dppp) / 72	228 / Fluoren ^a	-

^a Produkte durch GC-Analyse bestimmt. ^b Kommerziell erhältlich. ^c nach DC-Kontrolle

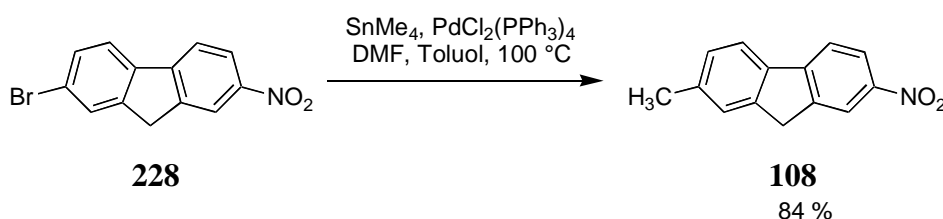
E.3.2 2-Methyl-7-nitrofluoren durch Stille-Kupplung

In Erweiterung der in Abschnitt E.2.1.3 vorgestellten Stille-Reaktion sind außer Aryl- oder Alkenyl- auch Alkyl-Zinnverbindungen (sp³-sp²-Kupplung)^{175,176} unter Palladium-Katalyse erfolgreich mit Arylhalogeniden gekuppelt worden.¹³⁴ Da Zinntetraalkyle deutlich weniger empfindlich als entsprechende Zink- oder Magnesiumverbindungen sind und Palladiumkatalysatoren in der Regel thermisch stärker als Nickelkatalysatoren belastet werden können, lassen sich die Reaktionsbedingungen dieser Kupplungsmethode im Hinblick auf die Temperatur und Lösungsmittel in wesentlich größeren Grenzen variieren. In der Literatur finden sich eine Reihe recht unterschiedlicher Protokolle zur Kupplung von Zinntetraalkylen mit Arylhalogeniden. So hat Milstein die Kupplung von verschiedenen substituierten Brombenzolen mit Tetramethylzinn in HMPTA bei 65 °C unter Katalyse von Benzylchlorobis(triphenylphosphin)-

palladium(II) beschrieben (Ausbeuten 85 - 98 %),¹⁷⁷ Viaud kuppelte 3-Brompyridinderivate mit Tetraalkylzinnverbindungen bei 110 °C mit Bis(triphenylphosphin)palladium(II)chlorid in Toluol (62 - 86 %),¹⁷⁸ und Nordvall verknüpfte Tetramethylzinn in 75 % Ausbeute mit einem 3-Brombenzofuran-Derivat in DMF unter Katalyse von Pd(OAc)₂/Tri-*o*-toluylphosphin bei 120 °C.¹⁷⁹

Tatsächlich gelang - in Anlehnung an diese Methoden - die Kupplung von Tetramethylzinn mit 2-Brom-7-nitrofluoren **228** in DMF/Toluol mit Pd(PPh₃)₂Cl₂ auf Anhieb in guter Ausbeute.

Abb. 60: 2-Methyl-7-nitrofluoren durch Stille-Kupplung

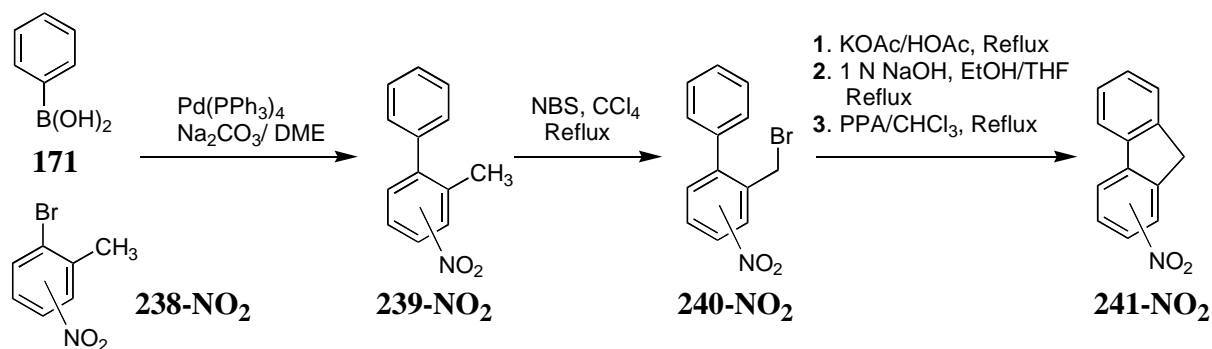


Ähnliche Ergebnisse sollten die Umsetzungen mit Ethyl-, Butyl- oder Pentylstannanen ergeben, die ebenfalls alle kommerziell erhältlich sind. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist – ganz abgesehen von toxikologischen Betrachtungen (siehe E.1 und E.2.1.3) –, daß sie sich nicht für die Einführung sterisch anspruchsvoller Alkylreste wie *tert*-Butyl- oder Adamantylgruppen eignet, da entsprechende Stannane nicht bekannt sind. Die denkbare Übertragung von CF₃-Gruppen, beispielsweise durch Sn(CF₃)₄ oder Sn(CF₃)R₃ ist bisher ebenfalls unerforscht. Weitere Stille-Kupplungen wurden daher nicht durchgeführt.

E.3.3 Regioselektiver Aufbau des Fluorengerüsts

Wie in Abb. 58 allgemein angedeutet, können Fluorenderivate auch regiospezifisch durch schrittweisen Aufbau des mittleren Ringes hergestellt werden. Ein solcher Weg wurde erstmals von Ihama und Sniekus eingeschlagen, die durch Suzuki-Reaktion von Phenylboronsäure **171** und verschiedenen 2-Bromnitrotoluolen **238-NO₂** zuerst die Aryl-Aryl-Bindung knüpften und nach Funktionalisierung der Methylgruppe (1. radikalische Bromierung zu **240-NO₂**, 2. S_N zum Benzylalkohol) durch intramolekulare Friedel-Crafts-Alkylierung den Ringschluß zu **241-NO₂** vollzogen.¹⁸⁰

Abb. 61: Regioselektiver Zugang zu 1-,2-,3- und 4-Nitrofluoren



Auf diese Weise waren in wenigen Schritten alle vier möglichen Mononitrofluorene ohne Verunreinigung durch Strukturisomere in guten Ausbeuten zugänglich. Prinzipiell sollte diese Methode bei Verwendung von *para*-substituierten Phenylboronsäuren auch zur Darstellung von 2-Nitrofluorenen mit Substituenten in der Position 7 geeignet sein. Im Hinblick auf entsprechende Alkylsubstituenten mit freien benzyliischen Wasserstoffatomen (also 7-Methyl-, 7-Ethyl-, 7-*iso*-Propyl, etc.) ergibt sich jedoch das Problem, daß bei der Funktionalisierung der späteren Methylbrücke durch NBS-Bromierung auch diese Wasserstoffatome substituiert werden können und daher kein einheitliches Produkt zu erwarten ist. Die Methylgruppe für die Brückenbildung muß also bereits vor der Kupplung funktionalisiert werden. Als mögliche Substrate kamen Benzylalkohole, ihre geschützten Analoga oder solche Verbindungen in Frage, die sich leicht in Benzylalkohole umwandeln lassen wie Carbonsäuren und Ester. Benzylhalogenide können dagegen nicht eingesetzt werden, da sie selbst leicht Kupplungsreaktionen eingehen. Da in der Literatur außer *ortho*-Methyl-Verbindungen kaum Kreuzkupplungen mit diesem Substitutionsmuster beschrieben worden sind – eines der wenigen Beispiele ist die Kupplung von 4-CN-C₆H₄ZnCl und 2-Iodobenzoesäuremethylester in 84 % mit Pd(dba)₂/TFP¹⁸¹ –, wurden eine Reihe entsprechender Testreaktionen durchgeführt.

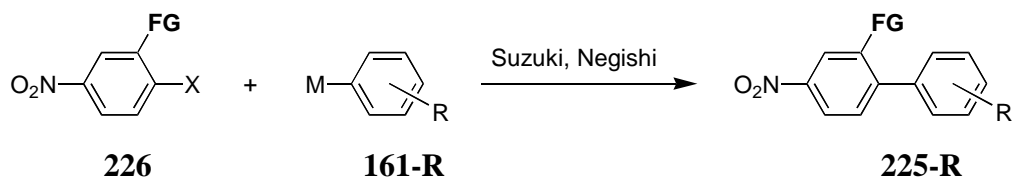
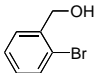
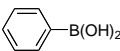
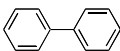
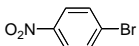
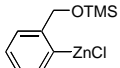
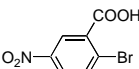
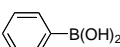
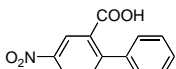
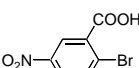
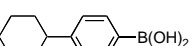
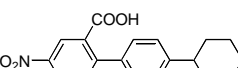
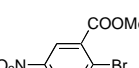
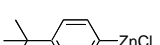
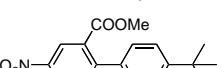
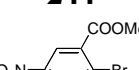
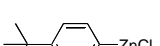
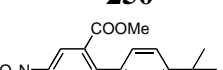
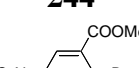

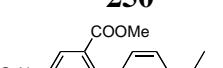
 Abb. 62: Testreaktionen zur Kupplung *ortho*-funktionalisierter Arylhalogenide


Tabelle 16: Testkupplungen mit *ortho*-funktionalisierten Arylhalogeniden

Eintrag	Aryl-halogenid	Aryl-Metall-Vb.	Methode ^a / Katalysator	Produkte	Ausbeute
1	 242	 171	A / Pd(PPh ₃) ₄	 173	36 %
2	 177	 245	B / Pd(PPh ₃) ₄	Polymer	-
3	 243	 171	C / Pd(OAc) ₂ / PTPPS	 248	^b
4	 243	 246	A / Pd(PPh ₃) ₄	 249	^b
5	 244	 247	B / Pd(PPh ₃) ₄	 250	52 %
6	 244	 247	B / Pd(dba) ₂ / TFP	 250	64 %
7	 244	 247	B / Pd(dba) ₂ / dppf	 250	71 - 83 %

^a Methode A: Kat. (3 mol%), Boronsäure (1.1 Äquiv.), Arylhalogenid (1.0 Äquiv.), Ba(OH)₂ (1.5 Äquiv.) in DME/Wasser bei 80 °C für 13 Stunden. Methode B: Kat. (3 mol%), Zinkaryl (1.2 Äquiv.), Arylhalogenid (1.0 Äquiv.), THF, RT, 16 Stunden. Methode C: Kat. (3 mol%), Boronsäure (1.1 Äquiv.), Arylhalogenid (1.0 Äquiv.), Na₂CO₃ (2.0 Äquiv.) in Wasser bei 80 °C für 10 Stunden. ^b Die Bildung der Verbindungen ist aus dem ¹H-NMR und der massenspektroskopischen Untersuchung eindeutig belegt.

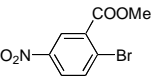
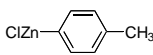
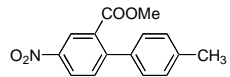
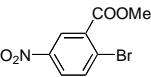
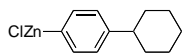
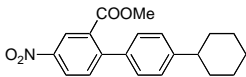
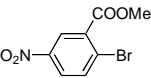
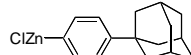
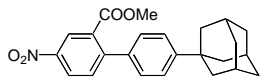
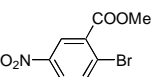
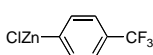
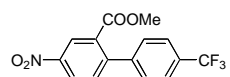
Die Kupplung von *o*-Brombenzylalkohol **242** mit Phenylboronsäure **171** (Eintrag 1) bzw. die Kupplung des TMS-geschützten Alkohols **245** (Eintrag 2) mit **177** ergaben kein Kreuzkuppelungsprodukt. Im ersten Fall wurde nur Homokuppelungsprodukt (**173**) gewonnen, im zweiten Fall entstand ein hochviskoses Polymer, das wahrscheinlich schon bei der Transmetallierung zur Zinkarylverbindung gebildet wurde.ⁱ Die Umsetzungen von 2-Brom-5-nitrobenzoesäure **243** mit Phenylboronsäure **171** in Anlehnung an ein Protokoll von Casalnuovo¹⁸² mit wasserlöslichen Pd(tppts)₃ (Eintrag 3) oder mit *para*-Cyclohexylphenylboronsäure **246** unter Standardbedingungen (Eintrag 4) ergaben zwar jeweils die gewünschten Kupplungsprodukte, diese konnten jedoch weder durch Säulenchromatographie noch durch Umfällen sauber isoliert werden. Die Negishi-Reaktion mit dem entsprechenden Ester **244** verlief dagegen sehr viel

ⁱ Zinkchlorid ist lewissauer und bewirkt statt der Transmetallierung die Spaltung des Silylethers.

besser und lieferte ein gut zu isolierendes Produkt **250** (Eintrag 5). Durch Austausch des Standard-Katalysators gegen $\text{Pd}(\text{dba})_2/\text{TFP}$ oder $\text{Pd}(\text{dba})_2/\text{dppf}$ wurden schließlich hohe Ausbeuten von **250** erhalten. Wichtig für den Erfolg dieser Kupplung ist die Aktivierung von **244** durch die zwei elektronenziehenden Gruppen, so daß trotz der sterischen Hinderung durch die Esterfunktion (in *ortho*-Position zum Bromid) eine ausreichende Reaktionsgeschwindigkeit bereits bei Raumtemperatur gewährleistet ist. Erhöhte man nämlich die Reaktionstemperatur, war die Umsetzung zwar schneller beendet, als Konkurrenzreaktion kam es aber verstärkt zur Reduktion der Nitrogruppe, es wurden mehr Nebenprodukte gebildet und so die Reinigung erschwert.

Nach dieser Methode gelang auch die Kupplung anderer 4-substituierter Zinkaryle.

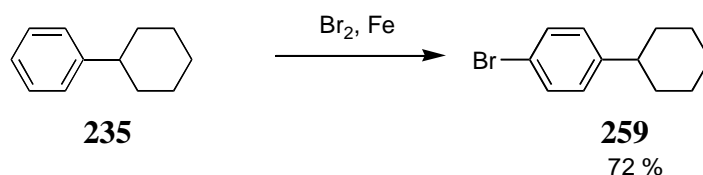
Tabelle 17: Darstellung von 4-Nitrobiphenyl-2'-estern durch Negishi-Kupplung

Eintrag	Aryl-halogenid	Aryl-Metall-Vb.	Katalysator ^a / Zeit (h)	Produkt	Ausbeute
1	 244	 251	2 mol % / 17	 255	70 %
2	 244	 252	3 mol % / 13	 256	75 %
3	 244	 253	2 mol % / 14	 257	64 %
4	 244	 254	2 mol % / 60	 258	76 %

^a $\text{Pd}(\text{dba})_2/\text{dppf}$.

Der für die Kupplungen benötigte 2-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester **244** war durch die säurekatalysierte Veresterung mit Methanol aus 2-Brom-5-nitrobenzoesäure **243** in sehr guter Ausbeute (90 %) leicht zugänglich. Die jeweils eingesetzten Zinkaryle wurden nach dem üblichen Verfahren durch Halogen-Metall-Austausch und Transmetallierung mit ZnCl_2 aus entsprechenden Bromarylen hergestellt. Das kommerziell nicht angebotene 4-(1-Adamantyl)-brombenzol ist bereits in Abschnitt E.2.2.2 beschrieben worden, 4-Brom-*cyclo*-hexylbenzol **259** wurde aus Benzol durch Friedel-Crafts-Alkylierung und Bromierung gewonnen.

Abb. 63: Darstellung von 4-Brom-cyclo-hexylbenzol



Für die geplante Cyclisierung mußten die Ester **250**, **255** - **258** in die entsprechenden Benzylalkohole überführt werden. Die chemoselektive Reduktion der Esterfunktionalität in Gegenwart einer aromatischen Nitrogruppe wurde durch die Zugabe von LiBH_4 in einem gemischten Lösungsmittelsystem aus Diethylether/THF und Methanol bei 0 °C erreicht (Ergebnisse siehe Tabelle 18). Nach Untersuchungen von Soai¹⁸³ erhöht die Zugabe von äquimolaren Mengen Methanol (bezogen auf LiBH_4) dabei einerseits die Reaktionsgeschwindigkeit, andererseits aber auch die Selektivität des Reagenzes.ⁱ Zur Vervollständigung der Reaktion war allerdings in allen Fällen ein großer Überschuß an Reduktionsmittel nötig.

Nach Sniekus entstehen Nitrofluorene durch intramolekulare Friedel-Crafts-Cyclisierung aus den Biphenylbenzylalkoholen beim Refluxieren in einem zweiphasigen System aus Polyphosphorsäure und Chloroform (vgl. Abb. 61). Im Widerspruch zu den publizierten Reaktionszeiten (~ 1 Tag) erfolgte die Cyclisierung bei den entsprechenden Experimenten in dieser Arbeit jedoch ausgesprochen langsam und lieferte das Fluoren **109** (aus **261**) erst nach 11 Tagen in 78 % Ausbeute (vgl. Tabelle 18). Eine wesentliche Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit konnte durch Modifizierung der Reaktionsbedingungen in Anlehnung an ein Verfahren von Eaton erreicht werden.¹⁸⁴ So wurden in einer Mischung aus PPA, Methansulfonsäure und Chloroform, die im Gegensatz zum obigen System die Kupplung in homogener Lösung erlaubt, die gewünschten Fluorene bereits über Nacht erhalten. Nur Verbindung **263**, die eine sehr stark deaktivierende CF_3 -Gruppe trägt, ergab statt des Fluorenderivates **129** ein vollständig zersetztes Material. Interessanterweise wurde bei dieser Reaktion intermediär die Bildung des entsprechenden Methansulfonsäureesters beobachtet. Anstatt einen Ringschluß einzugehen, der aus elektronischen Gründen bei **263** energetisch besonders ungünstig (CF_3 -Gruppe) und daher langsam ist, wird dieser Ester durch die oxidierend wirkende Methansulfonsäureⁱⁱ bei höheren Temperaturen mit der Zeit zerstört. Methansulfonsäureester werden wahrscheinlich auch bei den anderen Substraten gebildet. Aufgrund der höheren Reaktivität kommt es aber bei diesen sofort zur Cyclisierung, so daß entsprechende Ester als Zwischenprodukte nicht nachweisbar waren. Nach Modifikation der

ⁱ Der Ablauf der Reaktion ist komplizierter als auf den ersten Blick ersichtlich und wird beispielsweise durch die Alterung des Reagenzes ($\text{LiBH}_4/\text{MeOH}$), dessen genaue Struktur ungeklärt ist, stark beeinflusst. Tatsächlich wurde beobachtet, daß die Reaktionsgeschwindigkeit nach einiger Zeit stark abnahm.

ⁱⁱ Ähnlich wie konzentrierte Schwefelsäure wirkt auch Methansulfonsäure bei höheren Temperaturen oxidierend.

produkte nicht nachweisbar waren. Nach Modifikation der Reaktionsbedingungen gelang die Darstellung des CF_3 -substituierten 2-Nitrofluorens **129** in reiner Polyphosphorsäure (die nicht oxidierend wirkt) und etwas erhöhter Temperatur schließlich doch.

Abb. 64: Neuer regioselektiver Zugang zu 7-substituierten 2-Nitrofluorenen

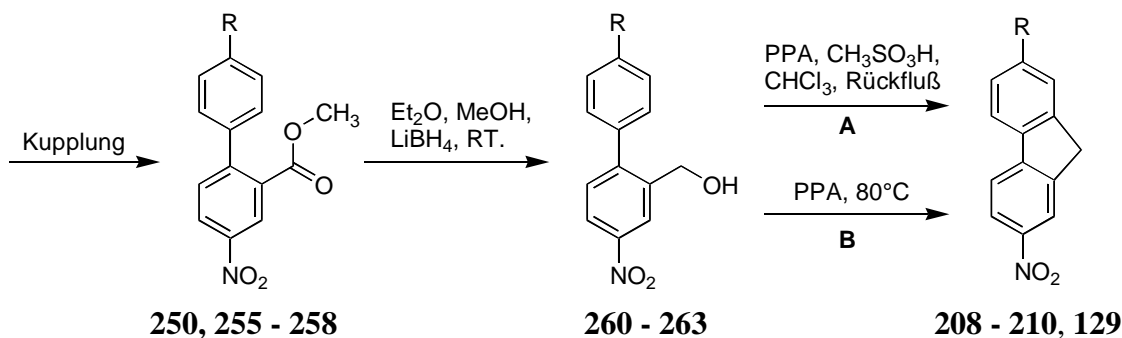


Tabelle 18: Darstellung von 2-Nitrofluorenen durch Reduktion und Cyclisierung

Eintrag	R =	Ester	Ausbeute (Alkohol)		Methode	Ausbeute (Fluoren)	
1	-Me	255	86 %	260	A	76 %	108
2	- <i>t</i> Bu	250	99 %	261	A	72 %	109
3	-Ad	257	90 %	262	A	69 %	110
4	-CF ₃	258	92 %	263	B	46 %	129

E.3.4 Darstellung der Aminofluorene durch Reduktion

Analog zu den 4-Aminobiphenylen aus Abschnitt E.2.2.7 wurden auch die 2-Aminofluorenderivate durch Reduktion der Nitroverbindungen dargestellt.

Tabelle 19: Darstellung der 2-Aminofluorene durch SnCl_2 -Reduktion

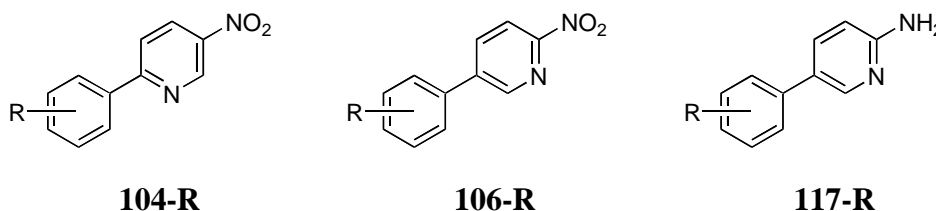
Eintrag	Edukt		Produkt		Ausbeute
1	7-Me-2NF	108	7-Me-2AF	119	96 %
2	7- <i>t</i> Bu-2NF	109	7- <i>t</i> Bu-2AF	120	92 %
3	7-Ad-2NF	110	7-Ad-2AF	121	90 %
4	7-CF ₃ -2NF	129	7-CF ₃ -2AF	133	95 %

Die bewährte Reduktion mit SnCl_2 lieferte sehr gute Ausbeuten, die Reaktionszeiten mußten jedoch stark erhöht werden. Verantwortlich dafür ist die schlechte Löslichkeit der 2-Nitrofluorene in dem verwendeten Lösungsmittelgemisch.ⁱ Alle 2-Aminofluorene sind in Lösung oxidationsempfindlich.

E.4 Heteroaromatische Verbindungen

Kreuzkupplungen können auch zur Herstellung heteroaromatischer Verbindungen, die sich vom Biphenyl ableiten, genutzt werden.ⁱⁱ Für die Mutagenitätsuntersuchungen wurden die substituierten Derivate **104-R**, **106-R** und **117-R** der isomeren Aza-4-amino/-4-nitrobiphenyle benötigt, bei denen eine CH-Einheit des Ringes durch Stickstoff ersetzt ist.

Abb. 65: Heteroaromatische Aza-4-amino-/Nitrobiphenyle

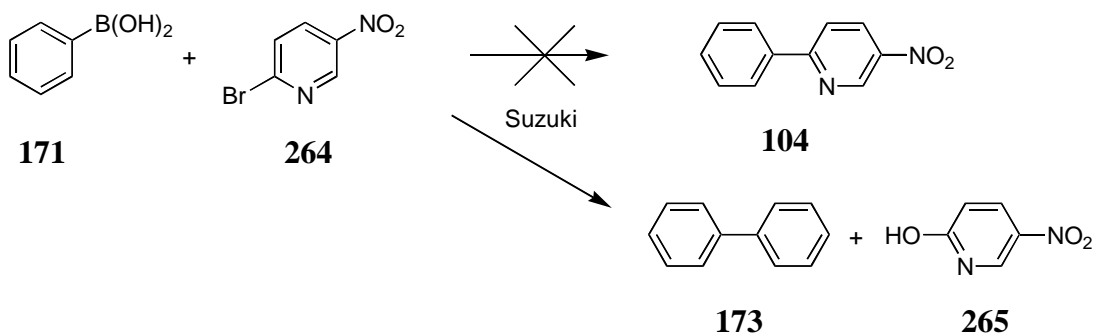


E.4.1 Darstellung substituierter 2-Aza-4-nitrobiphenyle

Erste Versuche zur Suzuki-Kupplung von 2-Brom-5-nitropyridin **264** mit Phenylboronsäure **171** mit NaOH oder $\text{Ba}(\text{OH})_2$ als Base ergaben jedoch kein Kreuzkupplungsprodukt. Die Analyse des Rohprodukts zeigte, daß neben gebildetem Biphenyl **173** (Homokupplungsprodukt) ein Teil des Heterocyclus **264** durch nukleophile Substitution des Broms in das entsprechende Phenol **265** überführt worden war. Unter den stark basischen Bindungen verlief die $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ -Reaktion am elektronenarmen Aromaten offensichtlich schneller als die Kupplung zum Biphenylderivat (Abb. 66).

ⁱ 2-Nitrofluorene sind prinzipiell nicht schwieriger zu reduzieren als 4-Nitrobiphenyle - tatsächlich liegen ihre LUMOs sogar etwas tiefer als die der Biphenyle.

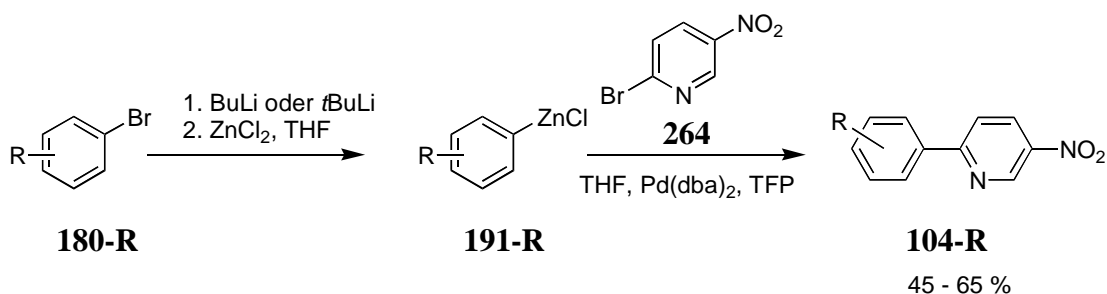
ⁱⁱ In der Literatur sind neben Boronsäuren und Zinkarylen auch magnesiumorganische Verbindungen als Kupplungskomponenten häufig eingesetzt worden (Kharash-Reaktion). Aufgrund ihrer hohen Reaktivität sind sie für Umsetzungen mit Nitroaromaten jedoch nur schlecht geeignet und ergeben niedrige Ausbeuten.¹⁵⁴

Abb. 66: Suzuki-Kupplung von **171** und 2-Brom-5-nitropyridin **264**

Grundsätzlich sollte die Abwesenheit von Wasser solche hydrolytischen Nebenreaktionen unterbinden. Tatsächlich führten wasserfreie Varianten nach Suzuki¹²⁹ oder Fu^{128b} mit Phenylboronsäuredi-*iso*-propylester als Kupplungspartner auch zum gewünschten Produkt. Nach kurzer Zeit brach die Reaktion jedoch ab und es kam zum Ausfall von metallischen Palladium, so daß die Umsätze sehr niedrig blieben (siehe Tabelle 20). Schlechte Ausbeuten wurden bei vergleichbaren Reaktionen auch in der Literatur beobachtet. Die Suzuki-Kupplung von Phenylboronsäure mit 2-Iodpyridin ergab beispielsweise nur 7 % Kreuzkupplungsprodukt.²⁷⁰

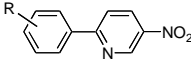
Bessere Ergebnisse konnten wiederum durch die Negishi-Reaktion von Zinkarylen **191-R** mit 2-Brom-5-nitropyridin **264** in THF bei Raumtemperatur erreicht werden.

Abb. 67: Negishi-Kupplung von Zinkarylen mit 2-Brom-5-nitropyridin



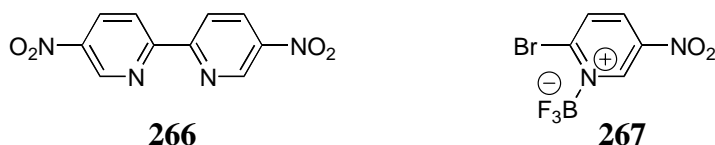
Allerdings waren auch mit der Negishi-Reaktion trotz Optimierung des Katalysatorsystems und überschüssigem metallorganischem Reagenz keine vollständigen Umsetzungen zu erzielen. Dieses Ergebnis war insofern erstaunlich, als das sehr elektronenarme Arylhalogenid **264** eigentlich schneller als beispielsweise 4-Bromnitrobenzol reagieren sollte. Auch Temperaturerhöhung (40 °C) brachte keine Abhilfe, da so zwar der Umsatz etwas gesteigert wurde, gleichzeitig aber auch vermehrt Nebenprodukte entstanden. Die isolierten Ausbeuten der gewünschten Verbindungen **104**, **105** und **143** waren daher mit 45 - 65 % eher mäßig (Einträge **4 - 7**, Tabelle 20).

Tabelle 20: Darstellung heteroaromatischer Nitrobiphenyle durch Negishi-Kupplung

Eintrag	Methode	Katalysator	Produkt		Ausbeute
1	Suzuki ^a	Pd(PPh ₃) ₄	2Ph5NP	104	0 %
2	Suzuki ^b	Pd(PPh ₃) ₄	2Ph5NP	104	< 10 %
3	Suzuki ^c	Pd(dba) ₂ /PCy ₃	2Ph5NP	104	< 20 %
4	Negishi ^d	Pd(PPh ₃) ₄	2Ph5NP	104	45 %
5	Negishi ^d	Pd(dba) ₂ /TFP	2Ph5NP	104	55 %
6	Negishi ^d	Pd(dba) ₂ /TFP	4' <i>t</i> Bu-2Ph5NP	105	61 %
7	Negishi ^d	Pd(dba) ₂ /TFP	4'MeO-2Ph5NP	143	65 %
8	" / BF ₃ -Schutz ^d	Pd(dba) ₂ /TFP	2Ph5NP	104	68 %

^a Kat. (3 mol%), Boronsäure (1.1 Äquiv.), 2-Brom-5-nitropyridin (1.0 Äquiv.), Ba(OH)₂ (1.5 Äquiv.) oder NaOH (3 Äquiv.) in DME/Wasser bei 80 °C. ^b Kat. (3 mol%), Boronsäure-*iso*-propylester (1.1 Äquiv.), 2-Brom-5-nitropyridin (1.0 Äquiv.), K₃PO₄ (1.5 Äquiv.) in DMF bei 85 °C. ^c Kat. (3 mol%), Boronsäure-*iso*-propylester (1.1 Äquiv.), 2-Brom-5-nitropyridin (1.0 Äquiv.), Cs₂CO₃ (2 Äquiv.) in Dioxan bei 80 °C. ^d Kat. (3 mol%), Zinkaryl (1.2 Äquiv.), 2-Brom-5-nitropyridin (1.0 Äquiv.), THF, RT, 16 Stunden.

Die Ursache für den vorzeitigen Abbruch all dieser Kupplungsreaktionen ist wahrscheinlich die Bildung von 5,5'-Dinitro-2',2-bispyridin **266**. Diese Verbindung wurde tatsächlich in einem Fall massenspektroskopisch als Nebenprodukt nachgewiesen. Bispyridine können mit Palladium sehr stabile Komplexe bilden, die katalytisch inaktiv sind und so den Katalysezyklus unterbrechen.

Abb. 68: 5,5'-Dinitro-2',2-bispyridin und der BF₃-Komplex von **264**

In einer weiteren Testreaktion wurde 2-Brom-5-nitropyridin **264** daher vor Zugabe des Zinkaryls mit BF₃-Et₂O umgesetzt (30 Min. Rühren bei RT), das mit dem Stickstoff des Pyridins einen stabilen Komplex **267** eingeht und dieses so als potentiellen Ligand für das Palladium unwirksam macht. Tatsächlich ergab die Kupplung in diesem Fall eine signifikante Ausbeuteerhöhung (+ 13 %). Dieser Ansatz ist möglicherweise generell geeignet, 2-Halogenpyridine in höheren Ausbeuten Palladium-katalysiert mit metallorganischen Reagenzien zu kuppeln.

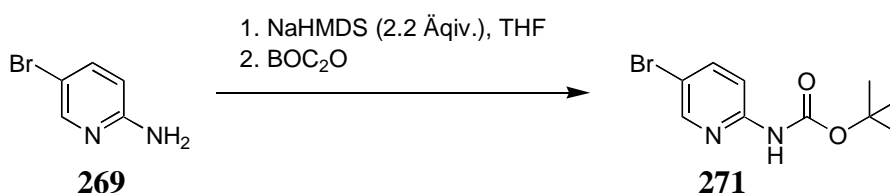
E.4.2 Darstellung substituierter 3-Aza-4-nitrobiphenyle

Für die Herstellung der isomeren 3-Aza-4-nitrobiphenyle **106-R** wurde ein relativ neues Verfahren von Bumagin eingesetzt, daß im Hinblick auf Reaktionszeit und Umsatz entscheidende

E.4.3 Darstellung substituierter 3-Aza-4-aminobiphenyle

Obwohl die 3-Aza-4-aminoderivate durch Sn(II)-Reduktion aus den entsprechenden Nitroverbindungen leicht zugänglich waren (2-Phenyl-5-aminopyridin wurde beispielsweise aus 2-Phenyl-5-nitropyridin in 85 % Ausbeute synthetisiert), wurde hier zusätzlich versucht, diese Verbindungen auch ohne vorhergehende Oxidation der Aminogruppe durch Suzuki-Reaktion herzustellen. Die direkte Umsetzung von 2-Amino-5-brompyridin **269** mit Phenylboronsäure **171** ergab das gewünschte Kupplungsprodukt allerdings nur in mäßiger Ausbeute (51 %, vgl. E.2.2.7). Zudem bildeten sich Nebenprodukte (z.B. 2-Aminopyridin), die sich z.T. nicht vollständig abtrennen ließen. Das freie Amin 2-Amino-5-brompyridin **269** sollte daher durch Einführung einer BOC-Gruppe geschützt werden. Während Anilinderivate schon beim Erhitzen mit Pyrokohlensäuredi-*tert*-butylester (BOC)₂O in THF reagieren, erforderte die geringe Nukleophilie der Aminogruppe von **269** eine vorhergehende Deprotonierung durch Zugabe von NaHMDS (2.2 Äquiv.).²⁶⁸

Abb. 71: BOC-Schützung von 2-Amino-5-brompyridin **269**



Die folgende Suzuki-Reaktion lieferte die Verbindungen **272-R** in deutlich besseren Ausbeuten ohne störende Nebenprodukte (Tabelle 22). Unter den stark basischen Reaktionsbedingungen kam es allerdings teilweise zur Abspaltung der BOC-Gruppe (~ 10 %). Dieser Effekt dürfte ebenfalls auf die geringe Basizität/Nukleophilie von **269** zurückzuführen sein, die die 2-Aminopyridineinheit zu einer potentiellen Austrittsgruppe macht. Schwaches Erwärmen mit Trifluoressigsäure lieferte die freien Amine **117**, **118** und **275** (Tabelle 22).

Abb. 72: Zugangsweg zu 2-Amino-5-phenylpyridinen

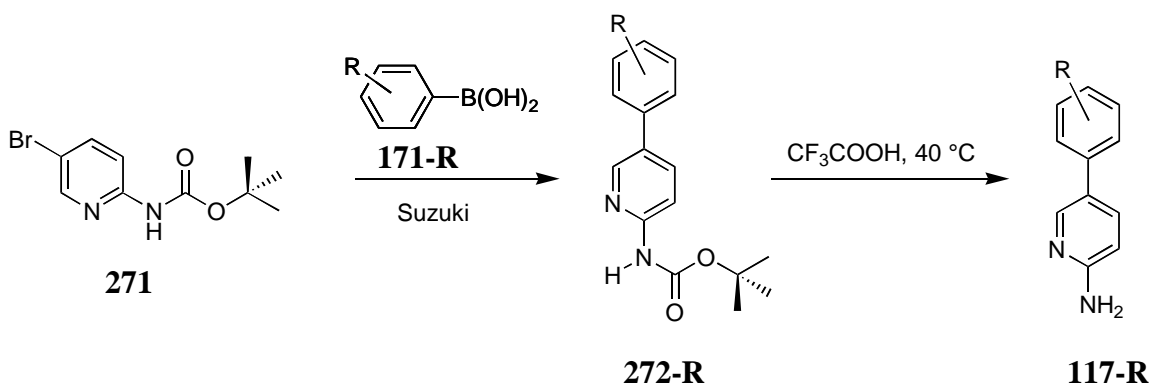
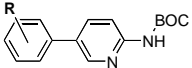
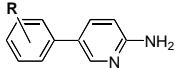


Tabelle 22: Darstellung von 2-Amino-5-phenylpyridinen durch Kupplung und Entschützung

Eintrag		Ausbeute		Ausbeute ^a
1	-H	272 71 %	5Ph2AP	117 72 %
2	- <i>t</i> Bu	273 68 %	4' <i>t</i> Bu-5Ph2AP	118 69 %
3	-OMe	274 65 %	4'MeO-5Ph2AP	275 75 %

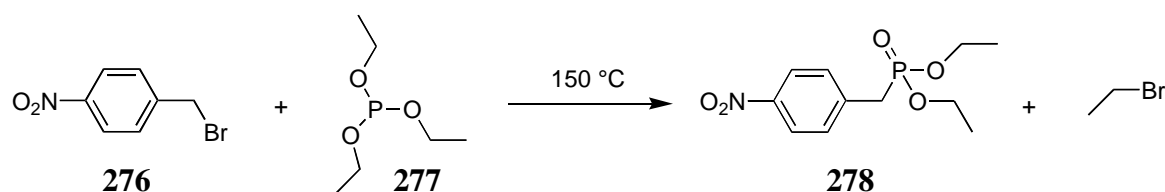
^a Bezogen auf die BOC-geschützten Verbindungen.

E.5 4-Nitro-/4-Aminostilbene

4-Nitrostilbene mit unterschiedlichen Alkylsubstituenten in der 4'-Position können am einfachsten durch Knüpfung der Doppelbindung synthetisiert werden. Hierzu eignen sich beispielsweise die Wittig-Olefinierung und ihre Varianten.¹⁸⁶ Für diese Arbeit wurden *trans*-Stilbene¹⁸⁷ benötigt. Während die normale Wittigreaktion jedoch häufig zu einem Gemisch von *cis*- und *trans*-Isomeren führt,ⁱ oder, wie bei der Darstellung von Nitrostilben aus Benzaldehyd und 4-Nitrobenzyliden(triphenyl)phosphoran, sogar hauptsächlich zum *cis*-Nitrostilben, sind *trans*-Nitrostilbene durch die nahe verwandte Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion zugänglich.¹⁸⁶

Als Phosphonat-Carbanion diente 4-Nitrobenzylphosphorsäurediethylester **278**, der nach Deussen durch Michaelis-Arbuzov-Reaktion aus Phosphorigsäuretriethylester **277** und 4-Nitrobenzylbromid **276** hergestellt wurde.²⁷¹

Abb. 73: Darstellung von 4-Nitrobenzylphosphorsäure-diethylester



Umsetzung des 4-Nitrobenzylphosphorsäurediethylesters **278** mit kommerziell erhältlichen *para*-alkylierten Benzaldehyden **279-R** nach einem Verfahren von Hanna²⁷² ergab die gewünschten Produkte **5-R** in guter Ausbeute mit einer *trans*-Selektivität von ~ 90 %. Entscheidend für diese hohe Stereoselektivität ist der elektronenziehenden Einfluß des Nitrogruppe,

ⁱ Die Stereoselektivität hängt von der Struktur des Ylids und den Reaktionsbedingungen ab. *Trans*-Alkene entstehen nach einer Faustregel bevorzugt aus stabilisierten Yliden oder wenn nach der Schlosser Variante gearbeitet wird.¹⁸⁷

CCOP(=O)(OCC)Cc1ccc([N+](=O)[O-])cc1 + O=Cc1ccc(R)cc1 $\xrightarrow{\text{EtOH, NaOEt}}$ O=Cc1ccc(R)cc1/C=C/c2ccc([N+](=O)[O-])cc2

278 + **279-R** $\xrightarrow{\text{EtOH, NaOEt}}$ **5-R**
 71 - 90 %

Eintrag	Edukt		Produkt		Ausbeute (<i>trans/cis</i>) ^a
1	-H	279	4NS	5	86 % (100/-)
2	-Me	280	4'Me-4NS	134	88 % (100/-)
3	-Et	281	4'Et-4NS	135	90 % (95/5)
4	-iPr	282	4'iPr-4NS	136	75 % (96/4)
5	-tBu	283	4'tBu-4NS	137	71 % (95/5),(100/-)

Diese Verunreinigungen sollten die Aussagekraft des Ames-Tests allerdings kaum stören, da nach einer Arbeit von Hooberman *cis*-Nitrostilbene deutlich weniger mutagen als ihre *trans*-Isomere sind.²³⁶ Trotzdem wurde zum Vergleich eine Probe der *tert*-Butylverbindung **137** durch Refluxieren mit Iod isomerisiert und nach Reinigung reines *trans*-4'-*tert*-Butyl-4-nitrostilben erhalten.

F Ergebnisse und Diskussion der Mutagenitäts-Untersuchungen

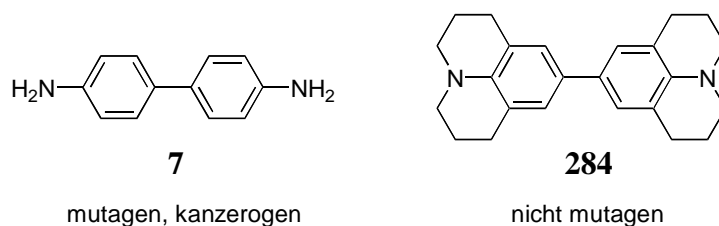
F.1 Modifikation der funktionellen Gruppe

F.1.1 Literaturüberblick

Im Gegensatz zu den größeren, von Pyren oder Benzo[*a*]pyren abgeleiteten polycyclischen Nitro- und Aminoaromaten, bei denen neben den Stickstoffsubstituenten auch ihr Kohlenstoffskelett selbst metabolisch durch Phase I und Phase II Reaktionen aktiviert werden kann (Ringoxidation, vgl. B.2), ist die Ames-Mutagenität ihrer kleineren Analoga mit zwei oder drei Ringen im wesentlichen an die Gegenwart der Nitro- oder Aminogruppe gebunden. So sind beispielsweise Biphenyl (wahrscheinlich auch dessen heteroaromatische Azaderivate), Fluoren¹⁸⁸, Carbazol¹⁸⁹ oder Stilben im Ames-Test nicht positiv, wohl aber ihre Amino- oder Nitroderivate (mono- und polysubstituiert).

Der erste logische Schritt zur Steuerung der Mutagenität eines gegebenen Nitro- oder Aminoaromaten mag – sofern der Stickstoffsubstituent nicht einfach weggelassen oder gegen einen anderen Rest ausgetauscht werden kann – die Modifikation der funktionellen Gruppe selbst sein. Schließlich werden nicht alle Stickstoffsubstituenten gleich schnell und effizient in elektrophile Metaboliten überführt. Dieser Ansatz wurde bereits 1982 von Ashby verfolgt (Abb. 75).¹⁹⁰ Er zeigte, daß 9,9'-Bijulolidyl **284** – eine vom Benzidin **7** abgeleitete Verbindung, bei der beide Aminogruppen in ein Ringsystem eingebaut sind – im Ames-Test nicht mutagen ist. Kolland hat 9,9'-Bijulolidyl **284** als Ersatzstoff für Benzidin in Bluttests vorgeschlagen.¹⁹¹ Nach Ashby ist der Mutagenitätsverlust wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß 9,9'-Bijulolidyl metabolisch nicht aktiviert werden kann.

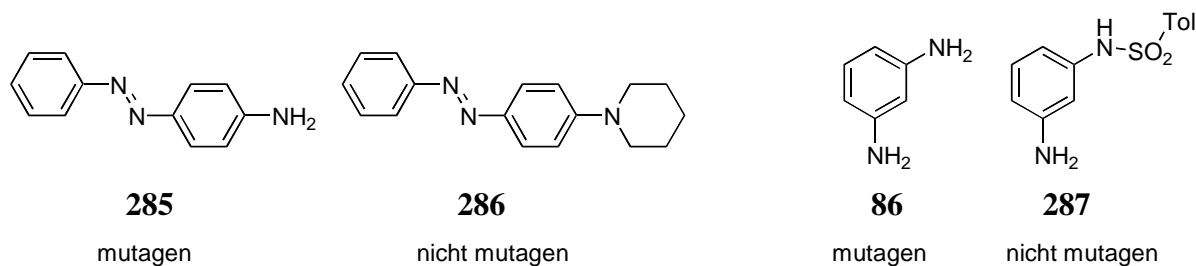
Abb. 75: Benzidin **7** und 9,9'-Bijulolidyl **284**



Ganz analog führte die Di-*n*-butylierung der Aminogruppe des mutagenen und kanzerogenen 4-Aminoazobenzols **285**, oder ihr Einbau in einen aliphatischen Sechsring **286**, ebenfalls zu

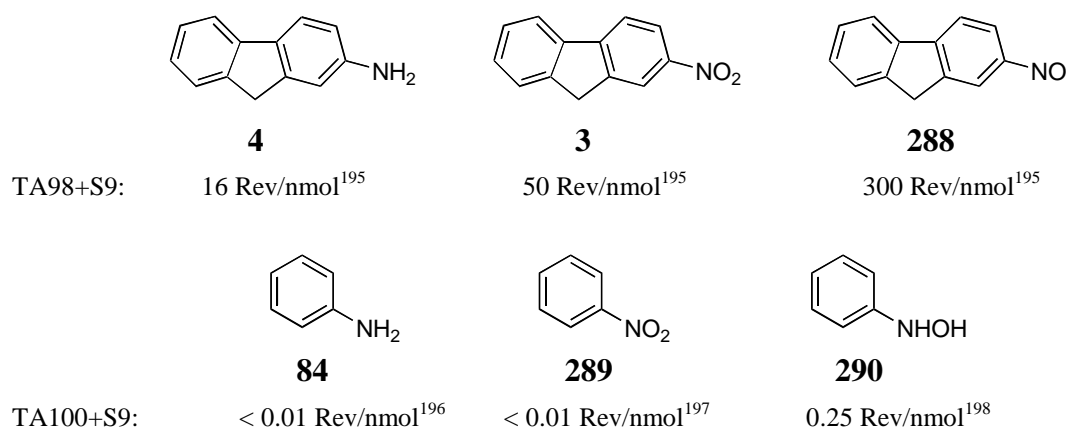
Derivaten ohne mutagenes oder kanzerogenes Potential (Abb. 76).¹⁹² Abgesehen von Alkylsubstituenten können auch typische Schutzgruppen für Amine das mutagene Potential verringern. Willeke hat beispielsweise durch Tosylierung einer Aminogruppe des *meta*-Phenylen-diamins **86** das nicht mutagene Derivat **287** hergestellt.¹⁹³

Abb. 76: Einfluß funktioneller Gruppen auf die Mutagenität



Als bereits aktivierte Metaboliten zeigen Nitrosoverbindungen und Hydroxylamine in der Regel genau den gegenteiligen Effekt. Im Ames-Test sind sie fast immer sehr viel aktiver als die entsprechenden Amino- oder Nitroverbindungen^{194,195} und geben positive Ergebnisse selbst dann, wenn ihre nicht aktivierten Verwandten nur sehr schwach oder gar nicht mutagen sind (Abb. 77).

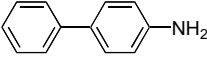
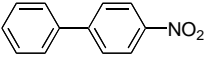
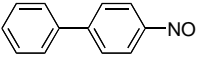
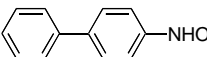
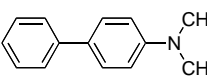
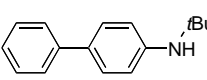
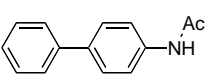
Abb. 77: Vergleich funktioneller Gruppen



F.1.2 Ergebnisse

Erstaunlicherweise gibt es in der Literatur kaum vergleichende Untersuchungen über den Einfluß der funktionellen Gruppe auf die Mutagenität bei gleichbleibendem Grundkörper. Wie stark unterscheidet sich das mutagene Potential von 4-Amino-, 4-Nitro-, 4-Nitroso- und 4-Hydroxylaminobiphenyl im Ames-Test unter Standardbedingungen? Wie wirksam sind einfache Modifikationen der Aminogruppe wie z.B. N-Alkylierung oder N-Acetylierung zur Aktivitätsreduktion? Können auf diese Weise nicht mutagene Derivate erhalten werden?

Tabelle 24: Mutagenität von Biphenylderivaten mit modifizierten funktionellen Gruppen

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 1-I)							
		TA98 -S9 ^d				TA100 -S9			
Positiv-Kontrolle ^a		2149		1151		902		795	
Negativ-Kontrolle	DMSO	36		47		176		180	
 4Abp 2	0 ^b	36 ^c	1.0^f	47	1.0	176	1.0	180	1.0
	10	52	1.4	166	3.5	171	1.0	588	3.3
	20	52	1.4	266 ^c	5.7	199	1.1	886 ^c	4.9
	100	53 ^c	1.5	435	9.3	200	1.1	1380	7.7
	500	56	1.5	536	11.4	235 ^c	1.1	1145	6.4
	2500 [*]	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0	0.0
 4NBp 1	0 ^b	36	1.0	47	1.0	176	1.0	180	1.0
	20	93	2.6	92	1.9	295	1.7	426	2.5
	100	227 ^c	6.3	285 ^c	6.0	676 ^c	3.8	1123 ^c	6.2
	500	282	7.8	356	7.5	752	4.3	1131	6.3
	2500 [*]	372	10.3	463	9.8	769	4.4	1203	6.7
	5000 [*]	701	19.5	582	12.4	1000	5.7	1369	7.6
 4NOBp 89	0 ^b	36	1.0	47	1.0	176	1.0	180	1.0
	10	280	7.9	372	7.8	620 ^c	3.5	948	5.3
	25	581 ^c	16.3	850	17.9	346	2.0	1371 ^c	7.6
	50	577	16.2	1214 ^c	25.8	303	1.7	1239	6.9
	100	390	11.0	1207	25.5	186	1.1	655	3.6
	500	0	0.0	671	14.2	0	0.0	63	0.4
 4NH(OH)Bp 90	0 ^b	36	1.0	47	1.0	176	1.0	180	1.0
	10	324	9.0	332	7.1	614 ^c	3.3	883	4.9
	25	708	19.7	737	15.7	559	3.2	1339 ^c	7.4
	50	992 ^c	27.6	1239 ^c	26.2	431	2.5	1237	6.9
	100	955	26.5	1285	27.3	340	1.9	524	2.9
	500	0	0.0	0	0.0	0	0.0	448	2.5
 N,N-DiMe-4ABp 91	0	36	1.0	47	1.0	176	1.0	180	1.0
	12.5	37	1.0	110 ^c	2.3	203	1.2	479 ^c	2.7
	25	38	1.1	89	1.9	207	1.2	424	2.4
	50	42 ^c	1.2	88	1.9	209 ^c	1.2	320	1.8
	100	39	1.1	89	1.9	218	1.2	281	1.6
	200	35	1.0	88	1.9	197	1.1	280	1.6
 N-<i>t</i>Bu-4ABp 92	0 ^b	36	1.0	47	1.0	176	1.0	180	1.0
	10	41	1.1	70	1.5	185	1.1	340	1.9
	20	44	1.2	90 ^c	1.9	188	1.1	450 ^c	2.5
	100	44 ^c	1.3	69	1.5	206 ^c	1.2	511	2.8
	500	59	1.7	72	1.5	219	1.2	503	2.8
	2500 [*]	42	1.2	48	1.0	228	1.3	1065	5.9
 N-Ac-4ABp 93	0	36	1.0	47	1.0	176	1.0	180	1.0
	12.5	35	1.0	87	1.8	210	1.2	209	1.2
	25	35	1.0	88 ^c	1.9	212	1.2	213	1.2
	50	42 ^c	1.2	88	1.9	217 ^c	1.2	266 ^c	1.5
	100	36	1.0	88	1.9	230	1.3	294	1.6
	200	33	0.9	88	1.9	209	1.2	295	1.6

* Ausfall, effektive Dosis geringer als angegeben. ^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Daten skaliert auf gleiche Spontanrevertanzahl. ^c Höchster Wert, der in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde. ^d ±S9 bedeutet, daß der Test mit (+) bzw. ohne (-) S9-Mix durchgeführt worden ist. ^e Revertanzahlen. ^f Induktionsfaktoren.

Für einen direkten Vergleich wurden hier die Mutagenitätsdaten von 4ABp **2**, 4NBp **1**, 4NOBp **89**, 4NH(OH)Bp **90**, N,N-DiMe-4ABp **91**, N-*t*Bu-4ABp **92** und N-Ac-4ABp **93** in

einer Testreihe (Testserie **1-I**) zusammengestellt. Während **2**, **1**, **91** und **93** in dieser Arbeit getestet wurden, sind die Daten von **89**, **90** und **92** den Arbeiten von Haack¹⁵² (**89**, **90**) und Glende¹⁵¹ (**92**) entnommen worden. Alle Verbindungen wurden im selben Ames-Labor mit DMSO als Lösungsmittel untersucht, allerdings teilweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Um die Aktivität quantitativ vergleichen zu können, sind alle Daten auf dieselben Spontanrevertantenzahlen skaliert worden. Bei 4ABp **2** und 4NBp **1** traten in den höchsten Dosierungen jeweils Substanzniederschläge auf.ⁱ Die Revertantenzahlen sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Wie erwartet induzierte 4ABp **2** in Gegenwart von S9-Mix hohe Revertantenzahlen und bestätigt damit das hohe mutagene Potential dieser Verbindung. Schon bei einer Dosierung von 10 µg lagen die Revertanten deutlich über dem Doppelten der Negativkontrolle. Bei Konzentrationen > 100 µg traten zudem cytotoxische Reaktionen auf, so daß die Dosis-Mutagenitäts-Beziehung in diesem Bereich nicht mehr linear anstieg. Dementsprechend nahm die Anzahl der Revertanten beim Übergang von 100 µg zu 500 µg – also einer Verfünffachung der Konzentration – in TA98+S9 nur wenig zu und ging in TA100+S9 sogar deutlich zurück. Bei der höchsten Dosierung (2500 µg) war die Cytotoxizität schließlich so stark, daß überhaupt keine Revertanten überlebten. Ohne S9-Mix war 4ABp **2** dagegen kaum mutagen, da *Salmonella* Amine nicht effizient N-hydroxylieren kann. In TA98-S9 wurden zwar Induktionsfaktoren bis 1.5 erreicht,ⁱⁱ in TA100-S9 stiegen sie aber nie über 1.1.

4NBp **1** erwies sich ebenfalls als eindeutig mutagen in beiden Stämmen. Im Gegensatz zu 4ABp **2** war die Aktivität nicht an die Gegenwart des Aktivierungssystems gebunden. Wie in Kapitel C erwähnt, verfügen TA98 und TA100 über geeignete Reduktasen, die Nitrogruppen in Nitrosoverbindungen und Hydroxylamine überführen können. Während die Mutagenität in TA98 mit und ohne S9 relativ gleich war, wurde in TA100+S9 eine signifikante Zunahme der Mutagenität beobachtet. Im Vergleich zu 4ABp **2** induzierte 4NBp **1** in TA98+S9 und TA100+S9 deutlich weniger Revertanten als **2** bei denselben Dosierungen. Offensichtlich erfolgt im Ames-Test die oxidative Metabolisierung der Aminofunktion (+4 % S9) effizienter als die reduktive Metabolisierung der Nitrogruppe. Insgesamt traten bei 4NBp **1** schwächere cytotoxische Effekte als bei 4ABp **2** auf. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung verlief zwar auch bei 4NBp **1** bei Dosierungen > 100 µg nicht mehr linear, aber selbst bei Zugabe von 5000 µg **1** starben nicht alle Revertanten ab.

ⁱ Substanzniederschläge werden durch die geringe Löslichkeit in Wasser verursacht.

ⁱⁱ Verantwortlich ist dafür möglicherweise die Oxidation des Amins durch Luftsauerstoff.

Am stärksten mutagen waren die Nitroso- und Hydroxylaminoderivate **89** und **90** und belegen damit ihre Bedeutung als reaktive Metaboliten. Die Aktivität beider Verbindungen war in beiden Stämmen sehr ähnlich und in TA98±S9 deutlich höher als in TA100±S9. Auch **89** und **90** erwiesen sich als stark cytotoxisch. Besonders in TA100-S9 war dieser Effekt bereits bei Dosierungen von > 10 µg so ausgeprägt, daß die Induktionsfaktoren nicht weiter zunahmen.

Bei den drei übrigen Verbindungen mit den modifizierten Aminogruppen N,N-DiMe-4ABp **91**, N-*t*Bu-4ABp **92** und N-Ac-4ABp **93** ergaben sich wieder große Unterschiede, je nachdem, ob S9-Mix zugesetzt wurde oder nicht. Ohne S9-Mix waren **91** und **93** in beiden Stämmen nahezu inaktivⁱ und induzierten keine Induktionsfaktoren größer als 1.3. Ähnlich verhielt sich N-*t*Bu-4ABp **92** in TA100-S9, in TA98-S9 wurde aber immerhin bei 500 µg ein Induktionsfaktor von 1.7 erreicht, so daß **92** unter diesen Bedingungen insgesamt als schwach mutagen eingestuft werden mußte. In Gegenwart des Metabolisierungszusatzes wurde die Aktivität von **91**, **92** und **93** signifikant erhöht. N,N-DiMe-4ABp **91** zeigte bereits in der niedrigsten Testkonzentration (12.5 µg) recht hohe Induktionsfaktoren, die aber aufgrund hoher Cytotoxizität nicht weiter anstiegen. Das mutagene Potential von **91** war damit in TA100+S9 fast genauso groß wie das von 4ABp **2** mit der freien Aminogruppe und in TA98+S9 ungefähr halb so groß. Die Modifikation der Aminogruppe durch N-*tert*-Butylierung bewirkte dagegen, daß die Mutagenität von **92** in Gegenwart von S9-Mix im Vergleich zu **2** deutlich langsamer anstieg. Cytotoxische Effekte verhinderten in TA98+S9 sogar, daß die Revertantenzahlen das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes überstiegen (max. Induktionsfaktor: 1.9). Aufgrund des klaren dosisabhängigen Anstiegs der Revertantenzahlen in TA98+S9 bei Konzentrationen bis 20 µg muß **92** aber in beiden Stämmen ebenfalls als mutagen eingestuft werden. Cytotoxische Effekte traten auch bei N-Ac-4ABp **93** in TA98+S9 auf. Obwohl schon bei niedrigen Konzentrationen fast eine Verdoppelung der Revertantenzahlen beobachtet wurde (Induktionsfaktor 1.8 bei 12.5 µg), stiegen diese mit zunehmender Dosierung nicht weiter an, so daß nie das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes überschritten wurde. In TA100+S9 war N-Ac-4ABp **93** dagegen kaum mutagen. In diesem Stamm führte die Acetylierung der Aminogruppe also zu einer klaren Verminderung der Mutagenität.

Das mutagene Potential von allen Verbindungen ist in Tabelle 25 zusammengefaßt. Die entsprechenden Werte wurden durch Regressionsanalyse (siehe C.5) aus den Mutagenitätsdaten

ⁱ Inaktiv im strengsten Sinne würde bedeuten, daß alle Induktionsfaktoren bei 1.0 liegen. Treten Induktionsfaktoren zwischen 1 und 2 auf, kann der Verbindung zwar ein mutagenes Potential zugeordnet werden, im Sinne der Definition von Ames gilt sie aber als nicht mutagen, solange Induktionsfaktoren von 2 nicht überschritten werden.

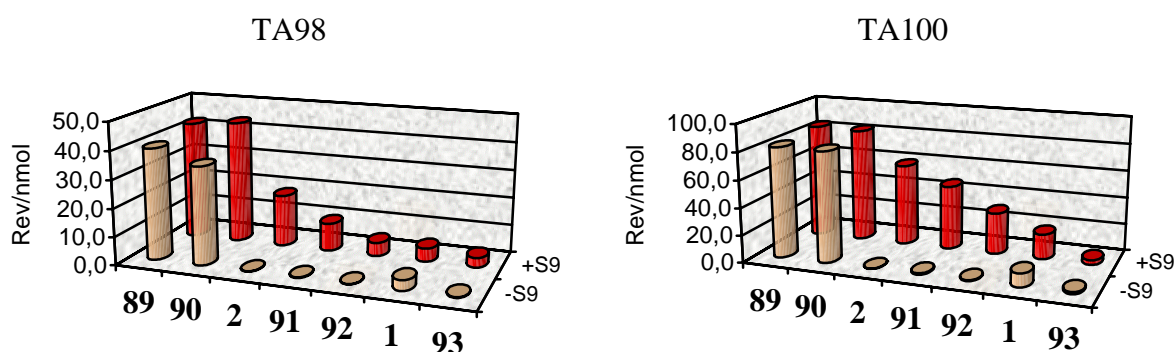
in Tabelle 24 berechnet. Die Werte sind zur besseren Übersicht nicht in Revertanten/nmol sondern in Revertanten/(10 nmol) angegeben und nach sinkender Mutagenität (in Gegenwart von S9) geordnet.

Tabelle 25: Einfluß der Modifikation der funktionellen Gruppe auf die Mutagenität

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4NOBp	89	39.69	42.49	81.35	84.47
4NH(OH)Bp	90	34.90	43.93	81.13	83.54
4ABp	2	0.16	18.53	0.18	59.74
N,N-DiMe-4ABp	91	0.24	9.94 ^a	1.11	47.19 ^a
N- <i>t</i> Bu-4ABp	92	0.12	4.84	0.60	30.42
4NBp	1	3.67	4.76	9.83	18.38
N-Ac-4ABp	93	0.27	3.46	1.46	3.47

^a nur ein verwertbarer Meßwert.

Abb. 78: Einfluß der Modifikation der funktionellen Gruppe auf die Mutagenität

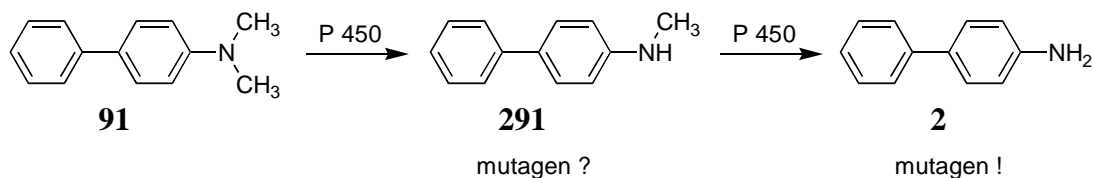


F.1.3 Diskussion

Während die abgestufte Mutagenität der Verbindungen **89**, **90**, **2** und **1** leicht verständlich ist und beispielsweise durch die unterschiedliche Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktionen erklärt werden kann, war für N,N-DiMe-4ABp **91** eigentlich eine geringere Mutagenität erwartet worden. Da **91** als tertiäres Amin keine freie NH-Gruppe mehr hat, kann hier keine direkte N-Hydroxylierung erfolgen und somit auch kein elektrophiles Nitreniumion gebildet werden, das mit der DNA reagieren könnte. Warum ist **91** also so stark mutagen? Tatsächlich ist bekannt, daß Methylgruppen an Heteroatomen wie Sauerstoff oder Stickstoff in Gegenwart von S9-Mix oxidativ leicht abgespalten werden.¹⁹⁹ So führt die Inkubation von N,N-Dimethylanilin mit CYP 450 beispielsweise durch Demethylierung zur Bildung von N-Methyl-

anilin und Anilin.²⁰⁰ Analoge Prozesse können beim Ames-Test die Entstehung von 4ABp **2** aus **91** bewirken.

Abb. 79: Demethylierung von *N,N*-DiMe-4ABp **91**



Möglicherweise trägt bereits das intermediär auftretende *N*-Methyl-4-aminobiphenyl **291** zur Mutagenität bei. Nach einer Studie von Gorrod können nämlich auch sekundäre aromatische Amine durch *N*-Hydroxylierung aktiviert werden und so mutagen wirken.²⁰¹ Sicher ist, daß die Konzentration der elektrophilen Metaboliten, die aus **91** und **2** gebildet werden, relativ ähnlich sein muß, da beide Verbindungen ein ähnlich hohes mutagenes Potential haben. Die Demethylierungsreaktion scheint also im Vergleich zur *N*-Hydroxylierung sehr schnell abzu-
laufen.

Über die genaue Aktivierung von *N*-*t*Bu-4ABp **92** ist nichts bekannt; eine direkte *N*-Hydroxylierung des sekundären Amins verliefte aus sterischen Gründen aber sicher nur langsam. Dealkylierungsreaktionen, bei denen an Stickstoff gebundene *tert*-Butylgruppen oxidativ abgespalten wurden, sind in der Literatur ebenfalls beobachtet worden.²⁰² Daher wäre es denkbar, daß auch in diesem Fall zuerst eine CYP-P450 katalysierte Dealkylierung und erst dann die *N*-Hydroxylierung stattfindet.¹⁵¹

Als Fazit bleibt festzuhalten, daß die Art der funktionellen Gruppen einen starken Einfluß auf die Mutagenität im Ames-Test hat. In Gegenwart von S9 nimmt die Mutagenität zumindest im Biphenyl-Fall in der Reihenfolge Nitroso ~ Hydroxylamino > Amino > Nitro ab. Die Dimethylierung der Aminofunktion reduziert die Mutagenität im Vergleich zum freien Amin nur wenig, da die Methylgruppen oxidativ leicht abgespalten werden. *Tert*-Butylierung oder Acetylierung der Aminogruppe führt zwar zu schwächer mutagenen Verbindungen (**92**, **93**), dieser Effekt ist aber nicht ausreichend, die Mutagenität völlig zu unterdrücken.

F.2 Einfluß von *ortho*-Alkylsubstituenten

Ein sinnvoller Ansatz zur Verringerung der Mutagenität von Amino- und Nitroaromaten besteht sicherlich darin, die Metabolisierung der funktionellen Gruppe zu inhibieren. Will man diese nicht selbst oder das Gerüst des Aromaten verändern, bietet es sich an, durch Einführung geeigneter Substituenten die Wechselwirkungen mit den aktivierenden Enzymen zu stören. Da für die Aktivierung ein räumlicher Kontakt der funktionellen Gruppe mit dem aktiven Zentrum des Enzyms notwendig ist, sollten sterisch anspruchsvolle Reste direkt neben der funktionellen Gruppe (in *ortho*-Position), die einen solchen Kontakt verhindern, die Metabolisierung und somit die Mutagenität verringern. Andererseits erhöhen sterisch anspruchsvolle Substituenten wie z.B. große Alkylgruppen auch die Hydrophobie einer Verbindung. Eine Zunahme der Hydrophobie bewirkt nach den QSAR-Analysen (vgl. D.4) aber genau den gegenteiligen Effekt – nämlich eine Zunahme der Mutagenität. Im folgenden wird der Einfluß von *ortho*-Alkylgruppen zusammenfassend dargestellt und analysiert. Entsprechende Studien an Amino- und Nitroaromaten mit unterschiedlich großen *ortho*-Alkylgruppen wurden ebenfalls in unserem Arbeitskreis durchgeführt.^{206,207,151}

F.2.1 Literaturüberblick

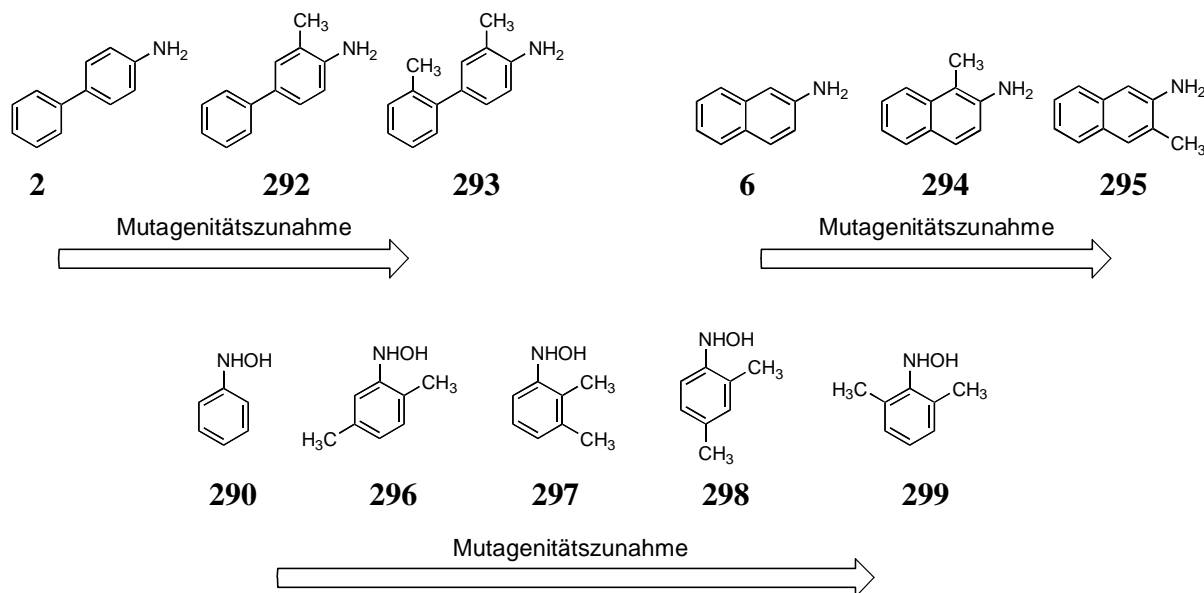
F.2.1.1 Methylsubstituenten

Über den Einfluß kleiner Alkylgruppen, die sich direkt neben der funktionellen Gruppe von Amino- und Nitroaromaten befinden, gibt es recht viele Untersuchungen. Bei aromatischen Aminen oder ihren N-oxidierten Derivaten (Hydroxylamine und Nitrosoverbindungen) führt ein zusätzlicher *ortho*-Methylsubstituent im allgemeinen zu einer Erhöhung der Aktivität im Ames-Test (Abb. 80).

Nach Studien von El-Bayoumy⁷⁸ und Hecht²⁰³ sind 3-Methyl-4-aminobiphenyl **292** und 2',3-Dimethyl-4-aminobiphenyl **293** stärker mutagen als 4-Aminobiphenyl **2**. Derselbe Effekt tritt bei den entsprechenden Hydroxylaminen und Nitrosoverbindungen auf. Auch die *ortho*-methylierten 2-Naphthylamine **294** und **295** sind deutlich aktiver als 2-Naphthylamin **6**. Von vielen heteroaromatischen Aminen ist ebenfalls bekannt, daß solche mit *ortho*-Methylgruppen in der Regel stärker mutagen sind als ihre unsubstituierten Analoga. Ebenso nimmt die Mutagenität bei Phenylhydroxylaminen (**290**, **296** - **299**) durch Einführung von *ortho*-Alkylgruppen zu.¹⁹⁸ Im Gegensatz zu Phenylhydroxylaminen scheinen bei Aminen zwei *ortho*-Methylgruppen die Mutagenität eher zu senken. So ist 3,5-Dimethyl-4-aminobiphenyl im

Standardtest weniger mutagen als 4-Aminobiphenyl,ⁱ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin ist sogar völlig inaktiv.¹⁹⁰

Abb. 80: Wirkung von *ortho*-Methylgruppen bei Aminen



Im Hinblick auf die Kanzerogenität wirkt sich die Anwesenheit einer *ortho*-Methylgruppe bei aromatischen Aminen ebenfalls aktivitätsverstärkend aus. So waren *ortho*-Toluidin, 2,4,5-Trimethylanilin, 2,4,6-Trimethylanilin und 2,4-Toluoldiamin im Tierversuch (Ratte, Maus) eindeutig kanzerogen, während für Anilin und 2,4-Diaminobenzol (*meta*-Phenylendiamin) eine kanzerogene Wirkung (trotz zahlreicher Tests) nicht zweifelsfrei erwiesen ist.²⁷

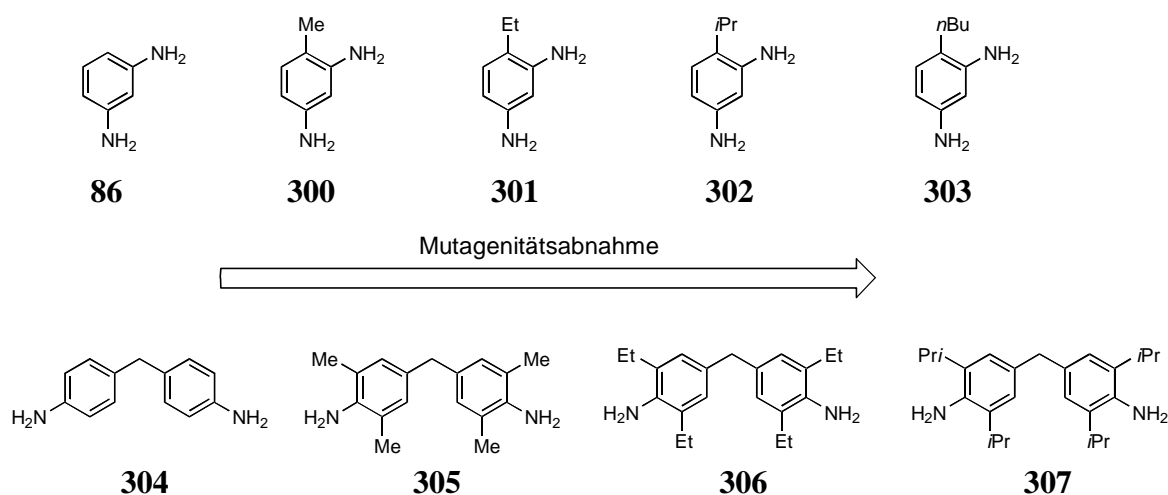
Bei Nitroaromen ist die Wirkung eines *ortho*-Methylsubstituenten weniger einheitlich und abhängig davon, ob der Test in Gegenwart von S9-Mix durchgeführt wurde oder nicht. Nitrobenzol ist nicht mutagen, bei 2-Nitrotoluol gibt es unterschiedliche Angaben, die zwischen nicht-mutagen¹⁹⁷ und schwach mutagen¹⁷ schwanken. 3-Methyl-4-nitrobiphenyl und 4-Nitrobiphenyl zeigten bei einer Studie von El-Bayoumy in beiden Stämmen sehr ähnliche Mutagenität, während 3-Methyl-2-nitronaphthalin und 1-Methyl-2-nitronaphthalin in TA98-S9 geringer mutagen waren als unsubstituiertes 2-Nitronaphthalin. In TA98+S9 oder in TA100±S9 erwies sich 1-Methyl-2-nitronaphthalin aber wieder ähnlich mutagen wie der Grundkörper.¹¹⁸ Zwei *ortho*-Methylgruppen bewirkten nach einer Untersuchung von Ashby dagegen eine klare Reduktion der Mutagenität. 3,5-Dimethyl-4-nitrobiphenyl war in keinem Bakterienstamm

ⁱ Beim Präinkubationstest findet man für 3,5-Dimethyl-4-aminobiphenyl und 4-Aminobiphenyl ungefähr gleich hohe Mutagenitäten. Eine Ausnahme ist 3,5-Dimethylbenzidin, das in TA98+S9 um den Faktor 6 stärker mutagen als unsubstituiertes Benzidin ist.

aktiv und erreichte selbst bei Präinkubation in hohen Dosierungen nicht das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes.¹⁹⁰

Im Vergleich zu Methylgruppen wurde dem Einfluß von größeren Alkylsubstituenten auf die Mutagenität in der Literatur weitaus geringere Aufmerksamkeit entgegengebracht. Shahin zeigte allerdings bereits 1980, daß es zumindest bei 2,4-Diaminoalkylbenzolen eine inverse Korrelation zwischen der Mutagenität und der Größe der Alkylsubstituenten gibt.²⁰⁴ Durch Einführung großer Reste wie *iso*-Propyl- oder *n*-Butylgruppen *ortho* zu einer der Aminofunktionen wurden nicht-mutagene Derivate von 2,4-Diaminobenzol **86** erhalten. Anstelle einer Mutagenitätserhöhung wie bei den Methylsubstituenten führen die sterisch anspruchsvolleren Gruppen also offensichtlich zur Abnahme der Mutagenität.

Abb. 81: Mutagenitätsrückgang durch sterisch anspruchsvolle Alkylgruppen



Einen weiteren Beleg für eine eventuelle sterische Hinderung lieferte Rao, der Alkylsubstituierte Derivate des industriell wichtigen 4,4'-Methylen-bis-anilins **304** in TA100+S9 und TA98+S9 getestet hat. Verbindungen mit einem sterisch anspruchsvollen oder zwei Alkylsubstituenten (2,6-Dimethyl **305**, 2,6-Diethyl **306**, 2,6-Di-*iso*-propyl **307**) *ortho* zur Aminogruppe waren weniger mutagen als der unsubstituierte Grundkörper **304** oder gar nicht aktiv.²⁰⁵

Die Literaturdaten lassen sich so zusammenfassen, daß die Mutagenität von Aminoaromaten, Hydroxylaminen und Nitrosoverbindungen durch Einführung einer *ortho*-Methylgruppe verstärkt wird, während bei Nitroaromaten kein einheitlicher Trend festzustellen ist. Zwei *ortho*-Methylgruppen führen bei Amino- und Nitroaromaten dagegen in der Regel zur Reduktion der Aktivität. Große *ortho*-Alkylgruppen scheinen die Mutagenität ebenfalls zu reduzieren.

F.2.1.2 Größere Alkylsubstituenten

Ob solche Mutagenitätsverringierungen auch auf andere Systeme mit *ortho*-Alkylgruppen übertragen werden können und damit eine allgemeingültige Struktur-Mutagenitäts-Beziehung vorliegt, wurde in unserem Arbeitskreis ausführlich untersucht. So hat Schmitt die 1-Alkyl-2-aminonaphthaline (1Alkyl-2AN) **6**, **308** - **311**, die 1-Alkyl-2-aminofluorene (1Alkyl-AF) **4**, **312** - **315** und die 3-Alkyl-4-aminobiphenyle (3Alkyl-4ABp) **2**, **316** - **319** synthetisiert und Ames-Tests durchgeführt.²⁰⁶ Entsprechende Untersuchungen an den 3,5-Dialkyl-4-aminobiphenylen **320** - **322** (3,5DiAlkyl-4ABp) stammen von Glende¹⁵¹ (Tabelle 26). Zur Vergleichsanalyse wurde auf Grundlage ihrer Daten wieder das mutagene Potential in Revertanten/(10 nmol) durch Regressionsanalyse nach dem in C.5 beschriebenen Verfahren berechnet. Es sind nur Daten aufgeführt, die in Gegenwart von S9-Mix erhalten wurden, da die meisten Amine ohne S9-Mix erwartungsgemäß inaktiv waren.

Abb. 82: *Ortho*-alkylierte 2-Aminonaphthaline, 2-Aminofluorene und 4-Aminobiphenyle

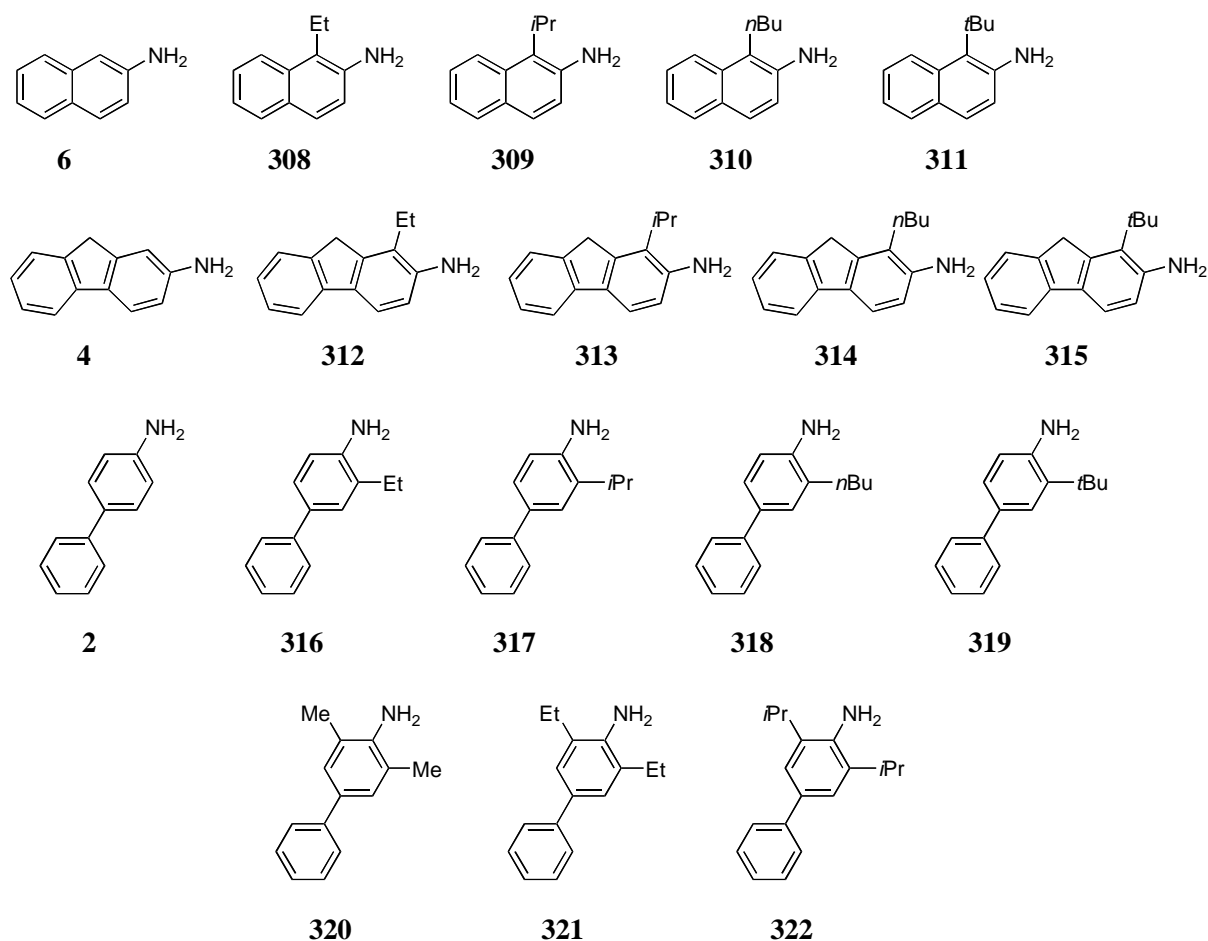


Tabelle 26: Überblick über die Mutagenitäten *ortho*-alkylierter Aminoaromaten

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
2AN	6	-	0.37	-	11.12
1Et-2AN	308	-	20.41	-	192.13
1 <i>i</i> Pr-2AN	309	-	2.39	-	47.81
1 <i>n</i> Bu-2AN	310	-	26.03	-	110.51
1 <i>t</i> Bu-2AN	311	-	< 0.10	-	1.52
2AF	4	-	3.20 ^a	-	106.01
1Et-2AF	312	-	5.31 ^a	-	103.44
1 <i>i</i> Pr-2AF	313	-	12.98	-	162.81
1 <i>n</i> Bu-2AF	314	-	21.29	-	55.82
1 <i>t</i> Bu-2AF	315	-	< 0.10 ^b	-	4.50
4ABp	2	-	45.13	-	83.51
3Et-4ABp	316	-	14.82	-	77.61
3 <i>i</i> Pr-4ABp	317	-	9.81	-	28.30
3 <i>n</i> Bu-4ABp	318	-	6.70	-	18.85
3 <i>t</i> Bu-4ABp	319	-	4.10	-	26.01
3,5DiMe-4ABp	320	-	0.46	-	4.33
3,5DiEt-4ABp	321	-	0.19	-	2.93
3,5Di <i>i</i> Pr-4ABp	322	-	< 0.10	-	0.49

^a Deutlich geringere Spontanrevertantenzahl. ^b Möglicherweise durch cytotoxische Reaktionen verfälscht.

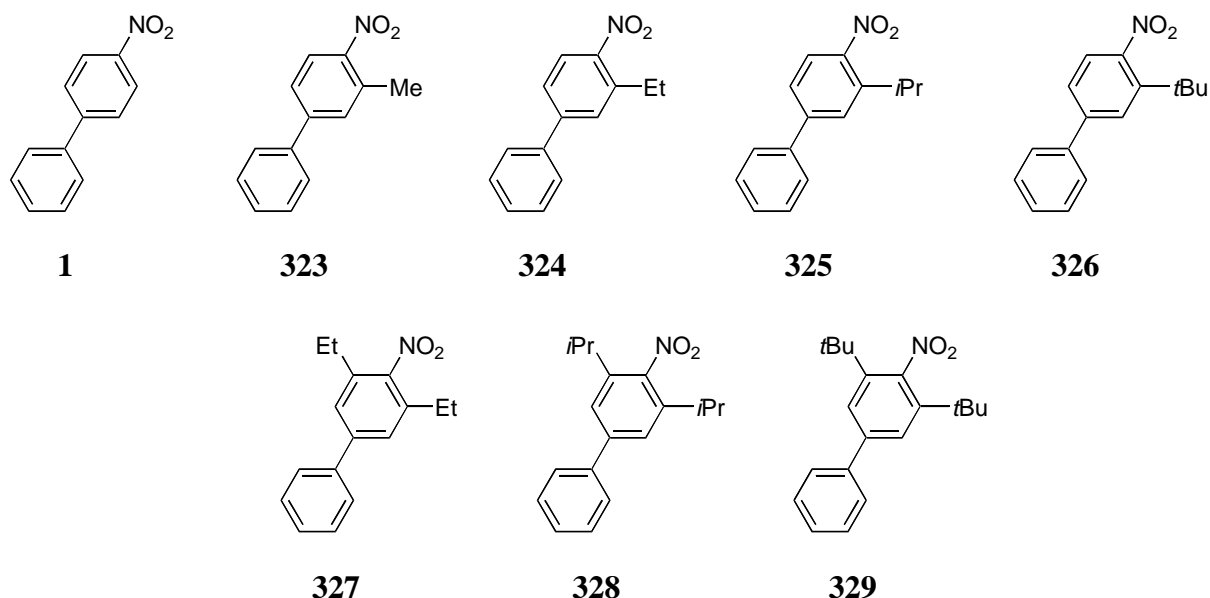
Aus Tabelle 26 ergibt sich, daß bei den 1-Alkyl-2-aminonaphthalinen und 1-Alkyl-2-amino-fluorenen die Mutagenität in beiden Teststämmen durch Einführung von Ethyl- (**308**, **312**), *iso*-Propyl- (**313**) und *n*-Butylgruppen (**311**, **314**) *ortho* zur Aminofunktion im Vergleich zu den Grundkörpern **2** und **4** stark zunimmt, aber durch die sehr sperrigen *tert*-Butylgruppen fast völlig eliminiert wird. 1*t*Bu-2AN **311** und 1*t*Bu-2AF **315** waren in TA98+S9 nicht aktiv und in TA100+S9 schwach mutagen. Die Revertantenzahlen der Aminofluorene in TA98+S9 wiesen allerdings eine signifikante Abweichung von den üblicherweise gemessenen Werten auf, die normalerweise deutlich höher liegen. Solche Abweichungen sind häufig in der Qualität des verwendeten S9-Mixes begründet, sie verfälschen aber den Trend innerhalb einer Meßreihe nicht.

Bei den 3-Alkyl-4-aminobiphenylen **316** - **319** waren die Verhältnisse etwas anders. Hier sank die Mutagenität kontinuierlich mit der Größe der Alkylreste ab, wurde aber weder in

TA98+S9 noch in TA100+S9 durch die *tert*-Butylgruppe vollständig ausgelöscht. 3*t*Bu-4ABp **319** war zwar weniger mutagen als 4ABp **2**, aber überstieg dennoch schon bei Konzentrationen ($> 20 \mu\text{g}$) das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes. In TA100+S9 war 3*t*Bu-4ABp **319** sogar relativ deutlich mutagen. Dieses Ergebnis ist durch neuere Untersuchungen bestätigt worden.¹⁵² Im Literaturüberblick hat sich gezeigt, daß die Einführung von zwei *ortho*-Alkylgruppen generell einen Rückgang der Mutagenität bewirkt. Die di-*ortho*-alkylierten Verbindungen **320** - **322** (Me, Et, *i*Pr) unterstreichen diesen Effekt. Bereits das Derivat mit zwei Ethylgruppen **321** war im Ames-Test nicht mehr aktiv.¹⁵¹

Der Einfluß von zunehmend größeren *ortho*-Alkylgruppen auf Nitroverbindungen ist bisher nur an mono- (3Alkyl-4NBp) und di-*ortho*-alkylierten 4-Nitrobiphenylen (3,5Dialkyl-4NBp) **323** - **329** von Voigtmann²⁰⁷ untersucht worden. Auch hier wurden zur besseren Vergleichbarkeit aus den Ames-Daten die Mutagenitäten in Revertanten/(10 nmol) durch Regressionsanalyse berechnet (Tabelle 27).

Abb. 83: *Ortho*-alkylierte 4-Nitrobiphenyle



In TA98-S9 nahm das mutagene Potential der Verbindungen **323** - **326** wie bei den *ortho*-alkylierten 4-Aminobiphenylen kontinuierlich mit der Größe der Alkylreste ab und führte im Fall von 3*t*Bu-4NBp **326** zu einer inaktiven Verbindung. In TA100-S9 ergab sich grundsätzlich ein vergleichbarer Trend: Die Mutagenität stieg zwar bei den Derivaten **323** und **324** mit kleinen Alkylresten (Me, Et) zuerst leicht an, fiel aber danach ebenfalls wieder deutlich ab. Zwei Alkylgruppen verstärkten diesen Effekt in beiden Stämmen: 3,5DiEt-4NBp **327** erwies sich als schwach mutagen und seine höheren Homologen mit den sperrigeren *iso*-Propyl- (**328**) und *tert*-Butylgruppen (**329**) waren jeweils inaktiv.

Tabelle 27: Überblick über die Mutagenitäten *ortho*-alkylierter 4-Nitrobiphenyle

Verbindung	F.2.1.3	Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4NBp	1	8.53	-	10.31	-
3Me-4NBp	323	4.64	-	24.30	-
3Et-4NBp	324	0.51	-	13.71	-
3 <i>i</i> Pr-4NBp	325	0.43	-	4.12	-
3 <i>t</i> Bu-4NBp	326	< 0.10	-	< 0.10	-
3,5DiEt-4NBp ^a	327	0.31	-	2.80	-
3,5Di <i>i</i> Pr-4NBp	328	0.10	-	< 0.10	-
3,5Di <i>t</i> Bu-4NBp	329	< 0.10 ^b	-	< 0.10 ^b	-

^a Verbindung 3,5DiMe-4NBp wurde nicht hergestellt. ^b Kein Mutagenitätsanstieg, aber schwache Cytotoxizität.

F.2.2 Diskussion

Im voranstehenden Abschnitt ist gezeigt worden, daß die Gegenwart großer Alkylsubstituenten, z.B. sperriger *tert*-Butylgruppen, in *ortho*-Position zu einer Verringerung oder sogar zur Auslöschung der Mutagenität bei Amino- und Nitroaromaten führt. Offensichtlich wird durch solche Alkylgruppen ein Schritt der Mutagenese inhibiert.

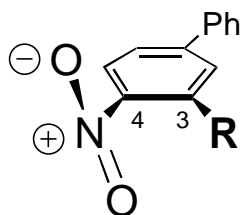
Bei den Aminen kommen hierfür die N-Hydroxylierung, die Aktivierung der OH-Gruppe durch Veresterung oder die Adduktbildung mit der DNA in Frage. Über die sterische Wechselwirkungen bei den letzten beiden Reaktionen sind zur Zeit keine gesicherten Aussagen möglich, da entsprechenden Studien bisher nicht durchgeführt wurden. Nach Abschnitt D.3.3 scheinen sterische Effekte aber am ehesten bei Oxidationsenzymen eine Rolle zu spielen. Tatsächlich ist bekannt, daß die Enzyme der CYP1A-Familie hydrophobe, aromatisch planare Substrate bevorzugen.³⁴ Sterisch anspruchsvolle Alkylgruppen in *ortho*-Position stören also wahrscheinlich die Bindung von Substanzen wie 1*t*Bu-2AN **311**, 1*t*Bu-2AF **315** und 3*t*Bu-4ABp **319** an die Oxidationsenzyme und verhindern auf diese Weise die Sauerstoffübertragung auf den Stickstoff.

Der tendenzielle Anstieg der Mutagenität, der bei Methyl- und anderen Alkylresten wie Ethyl- und *n*-Butylgruppen beobachtet wurde, ist nach den QSAR-Analysen durch die höhere Hydrophobie und die elektronische Wirkung der Alkylgruppen ebenfalls verständlich. Entweder liegt hier ein einfaches Transportphänomen vor (erleichterter Membrandurchtritt), vielleicht

gibt es aber auch bei den Aktivierungsenzymen in der Nähe des aktiven Zentrums hydrophobe Bereiche, die eine bessere Bindung der *ortho*-alkylierten Amine ermöglichen. Felton hat darauf hingewiesen, daß die intermediär gebildeten Nitreniumionen durch α -Methylgruppen stabilisiert werden.²⁰⁸ Ähnliche Stabilisierungen treten möglicherweise auch bei den hier diskutierten Verbindungen auf und bewirken so verstärkte Adduktbildung mit der DNA. Außerdem können Alkylreste in Gegenwart von S9-Mix in der Benzylposition oxidativ aktiviert werden und so eine Erhöhung der Mutagenität bewirken. Dieser Effekt wird in Abschnitt F.4 genauer diskutiert.

Auch der mutagenitätsreduzierende Einfluß großer Alkylreste bei den entsprechenden 4-Nitrobiphenylen hängt mit der Inhibierung des ersten Aktivierungsschrittes (Reduktion der Nitrogruppe) zusammen. Wie in Abschnitt D.3.1 erwähnt, zeigen polycyclische Nitroaromaten nach Studien von Vance,⁸⁴ Fu^{85a-c} und Jung^{85d} generell nur schwache oder gar keine direkte Mutagenität, wenn ihre Nitrogruppe rechtwinklig oder nahezu rechtwinklig zur aromatischen Ebene orientiert ist (Abb. 84).

Abb. 84: Verdrehung der Nitrogruppe durch Alkylsubstituenten



Dieser Zusammenhang gilt auch für die *ortho*-substituierten Nitrobiphenyle. Die Geometrien dieser Verbindungen wurden hier mit dem AM1-Verfahren ermittelt. Tatsächlich besteht bei den Verbindungen **1**, **323** - **329** eine gute Korrelation zwischen der Orientierung der Nitrogruppe und den experimentellen Mutagenitäten (Tabelle 28). Während bei 4NBp **1** und seinen Methyl- und Ethylderivaten **323** und **324** eine völlig koplanare Anordnung (Diederwinkel 0.0°) der Nitrogruppen zum Phenylring auftritt, die eine optimale Konjugation mit dem aromatischen System erlaubt, sind die Nitrogruppen bei 3iPr-4NBp **325** und 3,5DiEt-4NBp **327** signifikant aus der aromatischen Ebene herausgedreht. Beide Verbindungen weisen in TA98±S9 und TA100±S9 jeweils ein schwächeres mutagenes Potential auf als **1**, **323** oder **324**. Darüber hinaus ergeben die Rechnungen für 3tBu-4NBp **326**, 3,5DiPr-4NBp **328** und 3,5DiBu-4NBp **329**, die alle nicht oder extrem schwach mutagen sind, fast rechtwinklige Orientierungen der Nitrogruppe zum Phenylring (Diederwinkel > 69°). Solche Nitro-Anordnungen sind aus Kristallstrukturen von *ortho*-alkylierten Nitroverbindungen bekannt.

1,5-Di-*tert*-butyl-2,4-dinitrobenzol²⁰⁹ und 1,3,5-Tri-*iso*-propyl-2-nitrobenzol,²¹⁰ weisen beispielsweise Diederwinkel von 65° bzw. 86° auf. Hervorgerufen werden diese Abweichungen von der elektronisch begünstigten koplanaren Orientierung der Nitrogruppe durch die sterische Abstoßung zwischen der Nitrogruppe und den benachbarten Alkylsubstituenten.

Tabelle 28: Experimentelle Mutagenitäten und Orientierung der Nitrogruppe

Verbindung		Diederwinkel/°	Revertanten/(10nmol)	
		NO-Orientierung ^a	TA98-S9	TA100-S9
4NBp	1	0.0	8.53	10.31
3Me-4NBp	323	0.0	4.64	24.30
3Et-4NBp	324	0.0	0.51	13.71
3 <i>i</i> Pr-4NBp	325	28.8	0.43	4.12
3 <i>t</i> Bu-4NBp	326	75.5	< 0.10	< 0.10
3,5DiEt-4NBp	327	44.1	0.31	2.80
3,5Di <i>i</i> Pr-4NBp	328	69.9	0.10	< 0.10
3,5Di <i>t</i> Bu-4NBp	329	85.6	< 0.10	< 0.10
4NOBp	89	0.0	39.69	81.35
3 <i>t</i> Bu-4NOBp	330	3.1	22.91	114.82

^a C³C⁴NO

Fu hat vorgeschlagen, daß die Mutagenitätsreduktion möglicherweise einfach darauf zurückzuführen ist, daß die rechtwinkligen Nitrogruppen nicht mehr in das aktive Zentrum der Nitroreduktasen passen.^{85b} Tatsächlich scheint die Orientierung der Nitrogruppe einen größeren Einfluß auf die Aktivität zu haben als der sterische Anspruch der sperrigen Alkylgruppen selbst. Diese Annahme wird unterstützt durch die Mutagenitätsdaten der Nitrosoverbindungen 4NOBp **89** und 3*t*Bu-4NOBp **330**, die zusätzlich in Tabelle 28 aufgenommen wurden. So erweist sich das partiell reduzierte 3*t*Bu-4NOBp **330**, das potentielle Reduktionszwischenprodukt des inaktiven 3*t*Bu-4NBp **326**, als potentes Mutagen. Obwohl die Nitrosoverbindung **330** genau wie **326** eine raumfüllende *tert*-Butylgruppe trägt, ist ihr mutagenes Potential in TA98-S9 nur wenig kleiner als das des nicht substituierten 4-Nitrosobiphenyls (4NOBp) **89**. In TA100-S9 ist 3*t*Bu-4NOBp **330** sogar aktiver als der Grundkörper **89**. Im Gegensatz zu 4NBp **1** und 3*t*Bu-4NBp **326**, bei denen die Orientierung der Nitrogruppen ganz verschieden ist (0.0 ° ⇔ 75.5 °), sind die Nitrosogruppen in beiden Verbindungen (**89** und **330**) nahezu gleich (0.0 ° ⇔ 3.1 °) angeordnet. Die weitere Reduktion der koplanaren Nitrosogruppe, die Aktivierung des Hydroxylamins und die Reaktion mit der DNA werden durch die *ortho-tert*-

Butylgruppe offenbar nicht gestört, so daß 3*t*Bu-4NOBp **330** sein volles mutagenes Potential entfalten kann.

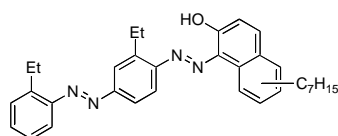
F.3 Einfluß von *para*-Alkylsubstituenten

Die Einführung sperriger *ortho*-Alkylgruppen ist also geeignet, die Mutagenität von Amino- und Nitroaromaten wirksam zu reduzieren. Praktisch angewendet wurde dieses Konzept zur Darstellung eines nicht mutagenen Azofarbstoffsⁱ mit einem Alkyl-substituierten Phenylendiamingerüst.²¹¹ Es muß jedoch kritisch hinterfragt werden, wie gut dieser Ansatz auch auf andere kommerziell genutzte Verbindungen übertragen werden kann. So ist schon die regioselektive Synthese von Verbindungen dieses Typs in der Regel relativ aufwendig.ⁱⁱ Ein anderes Problem betrifft die chemischen Eigenschaften der Amino- bzw. Nitrosubstituenten. Schließlich verhindern sterisch anspruchsvolle Alkylreste nicht nur die Aktivierung der funktionellen Gruppen im Ames-Test, sondern schränken ihre Reaktivität insgesamt ein. Es stellte sich also die Frage, ob sterische Veränderungen durch sperrige Alkylgruppen auch an anderen Positionen, weit entfernt von der funktionellen Gruppe, die Mutagenität reduzieren können.

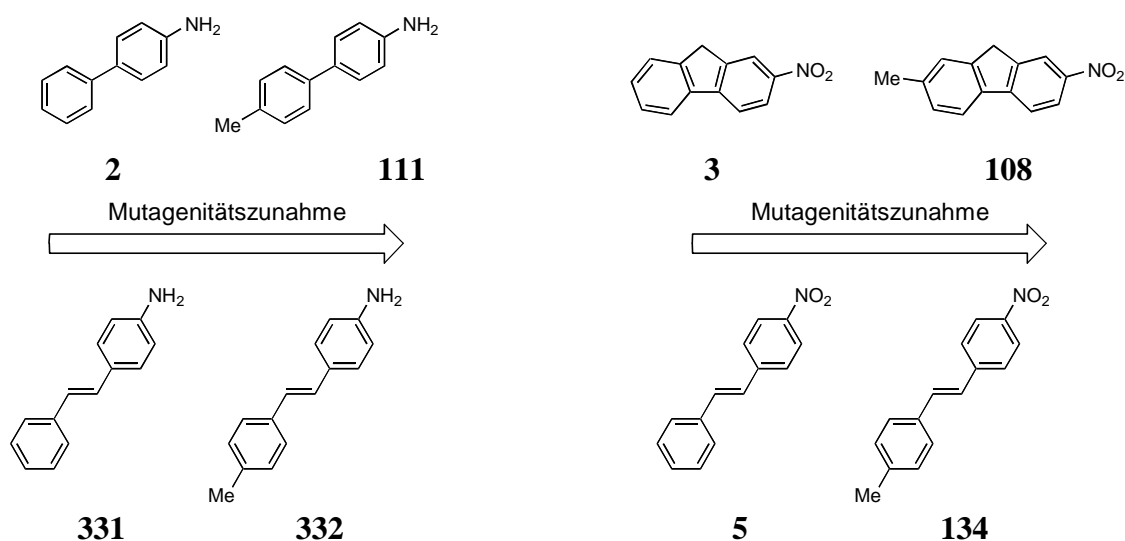
F.3.1 Literaturüberblick

In der Literatur sind bisher keine Mutagenitätsuntersuchungen an Verbindungen mit großen *para*-Alkylgruppen beschrieben worden. Nur über den Einfluß von *para*-Methylsubstituenten auf die Aktivität von Amino- und Nitroaromaten im Ames-Test liegen einige Daten vor. Auf deren Grundlage scheinen *para*-Methylgruppen im allgemeinen eine Erhöhung der Mutagenität zu verursachen (Abb. 85). So ist zwar z.B. *p*-Nitrotoluol in TA98±S9 inaktiv wie Nitrobenzol, aber im Gegensatz zu diesem in TA100+S9 deutlich mutagen,¹⁹⁷ 4'-Methyl-4-aminobiphenyl **111** ist in TA98+S9 um den Faktor 2 stärker aktiv als unsubstituiertes 4-Aminobiphenyl **2** (in TA100 sind beide ungefähr gleich mutagen), und 7-Methyl-2-nitrofluoren **108** zeigt ebenfalls höhere Mutagenität in TA98-S9 als sein unsubstituierter Grundkörper **3**.¹⁹⁵ Ähnliche Mutagenitätsanstiege sind auch von 4'-Methyl-substituierten 4-Amino-/4-Nitrostilbenen bekannt.

ⁱ Dieser nicht-mutagene Azofarbstoff dient zum Anfärben von Benzin und Öl.



ⁱⁱ Schmitt und Voigtmann haben *ortho*-substituierte Amino- und Nitroaromaten beispielsweise durch Umsetzung der Nitroaromaten mit entsprechenden Grignardverbindungen erhalten. Diese Reaktionen lieferten ein komplexes Stoffgemisch, aus dem die gewünschten Produkte nur in sehr niedrigen Ausbeuten isoliert werden konnten.

Abb. 85: Wirkung von *para*-Methylgruppen

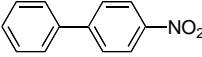
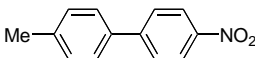
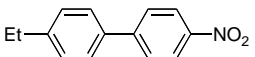
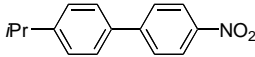
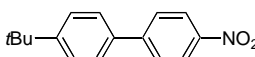
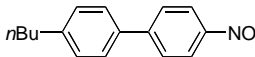
Was passiert, wenn man statt Methylgruppen größere Alkylreste einführt, die die Amino- oder Nitrogruppe nicht direkt beeinflussen, sondern nur die molekulare Gestalt in ihrer dreidimensionalen Ausdehnung ändern? Nimmt die Mutagenität einfach mit steigender Hydrophobie zu oder gibt es auch hier einen sterischen Effekt, der zu einer Mutagenitätsreduktion führt? In dieser Arbeit wurden die entsprechenden Modellverbindungen an den *Salmonella*-Stämmen TA98±S9 und TA100±S9 untersucht. Die getesteten Verbindungen umfassen dabei Derivate von Nitroaromaten (4-Nitrobiphenyl, 2-Phenyl-5-nitropyridin, 5-Phenyl-2-nitropyridin, 2-Nitrofluoren, 4-Nitrostilben) und Aminoaromaten (4-Aminobiphenyl, 5-Phenyl-2-aminopyridin, 2-Aminofluoren)

F.3.2 Ergebnisse – Nitroaromaten

In einer ersten Testserie (Testserie **2-I**) wurde die Mutagenität für den Grundkörper 4-Nitrobiphenyl (4NBp **1**) und die entsprechenden Derivate mit Methyl- (**94**), Ethyl- (**95**), *iso*-Propyl (**96**), *n*-Butyl (**97**) und *tert*-Butylgruppen (**98**) ermittelt (Tabelle 29). Um auch geringe genotoxische oder cytotoxische Aktivitäten zu entdecken, wurden auch sehr hohe Substanzdosierungen miteinbezogen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln traten in den höchsten Konzentrationen jeweils Substanzniederschläge auf, so daß die reale Dosis etwas unter der angegebenen lag.ⁱ

ⁱ Diese Daten geben die Mutagenität im Sättigungsbereich an und dürfen für die Berechnung des mutagenen Potentials nicht herangezogen werden.

Tabelle 29: Mutagenitätsdaten von 4'-Alkyl-4-nitrobiphenylen

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 2-I)							
		TA98 -S9		+S9		TA100 -S9		+S9	
Positiv-Kontrolle ^a	DMSO	2149		1151		902		795	
Negativ-Kontrolle ^b		37		67		207		206	
 4NBp 1	0	37	1.0	67	1.0	207	1.0	206	1.0
	20	96	2.6	131	1.9	347	1.7	488	2.4
	100	233 ^b	6.3	406	6.0	795 ^b	3.8	1285	6.2
	500	290	7.8	508	7.5	885	4.3	1294	6.3
	2500	382	10.3	660	9.8	904	4.4	1377	6.7
	5000*	721	19.5	830	12.3	1177	5.7	1567	7.6
 4'Me-4NBp 94	0	37	1.0	67	1.0	207	1.0	206	1.0
	10	108	2.9	-	-	-	-	-	-
	20	134	3.6	286	4.2	313	1.5	794	3.9
	100	174 ^b	4.7	677	10.1	348 ^b	1.7	1682	8.2
	500	188	5.1	682	10.1	368	1.8	1518	7.4
	2500	222	6.0	700	10.4	389	1.9	1213	5.9
 4'Et-4NBp 95	0	37	1.0	67	1.0	207	1.0	206	1.0
	20	84	2.3	295	4.4	281	1.4	556	2.7
	100	165	4.5	297	4.4	330 ^b	1.6	860	4.2
	500	297 ^b	8.0	304	4.5	343	1.7	883	4.3
	2500*	338	9.1	430	6.4	436	2.1	998	4.9
	5000*	566	15.3	650	9.7	632	3.1	1105	5.4
 4'iPr-4NBp 96	0	37	1.0	67	1.0	207	1.0	206	1.0
	20	50	1.3	87	1.3	200	1.0	449	2.2
	100	50	1.3	86	1.3	213	1.0	481	2.3
	500	66	1.8	92	1.4	213	1.0	412	2.0
	2500*	158 ^b	4.3	198	2.9	293 ^b	1.4	400	1.9
	5000*	271	7.3	279	4.1	327	1.6	119	0.6
 4'tBu-4NBp 97	0	37	1.0	67	1.0	207	1.0	206	1.0
	20	45	1.2	62	0.9	206	1.0	209	1.0
	100	53	1.4	63	0.9	203	1.0	209	1.0
	500	50	1.4	68	1.0	210	1.0	227	1.1
	2500*	140 ^b	3.8	196	2.9	409 ^b	2.1	382	1.9
	5000*	151	4.1	219	3.3	510	2.5	591	2.9
 4'nBu-4NBp 98	0	37	1.0	67	1.0	207	1.0	206	1.0
	20	52	1.4	107	1.6	248	1.2	330	1.6
	100	74	2.0	107	1.6	269	1.3	350	1.7
	500	185 ^b	4.0	141	2.1	290 ^b	1.4	453	2.2
	2500*	200	5.4	248	3.7	373	1.8	824	4.0
	5000*	255	6.9	456	6.8	414	2.0	906	4.4

* Ausfall, effektive Dosis geringer als angegeben. ^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

Nach Tabelle 29 induzierte der Grundkörper 4NBp **4** in TA98 – in völliger Übereinstimmung mit publizierten Mutagenitätsdaten von Nohara⁷⁹ oder El-Bayoumy¹¹⁸ – mit und ohne metabolische Aktivierung hohe Revertantenzahlen. Bei den Untersuchungen von Voigtmann mit genau derselben Verbindung – allerdings in einem anderen Ames-Labor – war eine etwas höherer Mutagenität in TA98±S9 und eine etwas niedrigere Mutagenität in TA100±S9 festgestellt worden.²⁰⁷ Ähnlich aktiv erwiesen sich auch die Methyl- und die Ethylverbindung (**94**

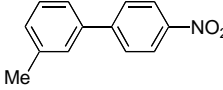
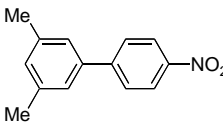
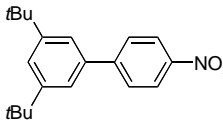
und **95**), die ebenfalls bereits bei niedrigen Konzentrationen (10 - 100 µg) in TA98 (\pm S9) und TA100 (+S9) Revertantenzahlen deutlich über dem Doppelten des Lösungsmittelkontrollwertes induzierten. Bei höheren Konzentrationen führten cytotoxische Effekte jeweils zu einem Abflachen der entsprechenden Dosis-Wirkungskurven. Die Aktivität fast aller Verbindungen nahm in Gegenwart von S9-Mix zu, besonders deutlich bei 4'Me-4NBp **94**, das unter diesen Bedingungen klar stärker mutagen als 4NBp **1** war. Auf dieses Phänomen wird in Abschnitt F.4 genauer eingegangen.

Im Vergleich zu den Derivaten mit den kleinen Alkylresten lagen sowohl die Mutagenität als auch die Zelltoxizität von 4'*i*Pr-4NBp **96** und 4'*t*Bu-4NBp **97** mit ihren sterisch anspruchvolleren *iso*-Propyl- und *tert*-Butylgruppen in TA98 \pm S9 deutlich niedriger. Schwache Aktivität trat nur bei den höchsten Konzentrationen auf, während bis 500 µg die Revertantenzahlen unter dem Doppelten des Lösungsmittelkontrollwertes blieben. Ein bemerkenswerter Effekt trat bei 4'*n*Bu-4NBp **98** auf, das sich von 4'*t*Bu-4NBp **97** nur in der Sperrigkeit des Alkylrestes unterscheidet (die Hydrophobie beider Verbindungen ist nahezu gleich). Im Ames-Test zeigte 4'*n*Bu-4NBp **98** nämlich eine signifikant höhere Mutagenität als die *tert*-Butyl-Verbindung **97**. Dies deutet an, daß die Mutagenitätsabnahme sterische Ursachen hat.

Die Ergebnisse in TA100 \pm S9 belegten einen ähnlichen Trend wie in TA98 \pm S9. 4'*i*Pr-4NBp **96** und 4'*t*Bu-4NBp **97** waren auch in diesem Stamm die schwächsten Mutagene. Ohne Zusatz von S9-Mix war die Aktivität aller substituierten Nitrobiphenyle eher schwach und nur das unsubstituierte 4NBp **1** zeigte schon bei niedrigen Konzentrationen eine eindeutige mutagene Wirkung. 4'*i*Pr-4NBp **96** blieb dagegen bei allen Konzentrationen unter dem Doppelten der Lösungsmittelkontrollwerte. Wie in TA98+S9 nahm auch in TA100+S9 die Mutagenität aller Verbindungen zu, allerdings bei 4'*t*Bu-4NBp **97** weniger als bei 4'*i*Pr-4NBp **96**, so daß unter diesen Bedingungen die *tert*-Butyl-Verbindung **97** am schwächsten mutagen war.

Zur Untersuchung, ob ähnliche Effekte auch auftreten, wenn die Alkylreste an andere Positionen gebunden sind, wurden in Testserie **2-II** die 3'-Alkyl-substituierten 4-Nitrobiphenyle **99** - **101** getestet (Tabelle 30). Da bei den Substanzen der Testserie **2-I** in allen Fällen in den höchsten Dosierungen (5000 µg) Niederschläge aufgetreten waren, erfolgte der Test diesmal in einem etwas kleinerem Konzentrationsbereich (0, 10, 20, 100, 500, 2500 µg).

Tabelle 30: Mutagenitätsdaten von 3'-Alkyl- und 3',5'-Dialkyl-4-nitrobiphenylen

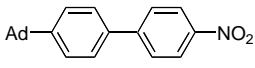
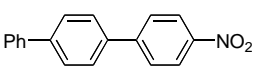
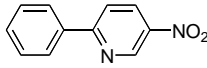
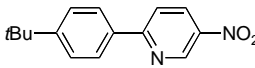
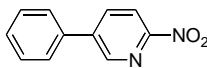
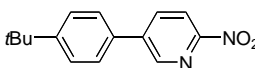
Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 2-II)							
		TA98 -S9				TA100 -S9			
Positiv-Kontrolle ^a	DMSO	2767		1890		916		1759	
Negativ-Kontrolle ^b		36		44		168		177	
 3'Me-4NBp 99	0	36	1.0	44	1.0	168	1.0	177	1.0
	10	39	1.1	234	5.3	228	1.4	1027	5.8
	20	42	1.1	244	5.5	237	1.4	1073	6.1
	100	77	2.1	310 ^b	7.0	438	2.6	1158 ^b	6.5
	500	390 ^b	10.7	819	18.5	1663 ^b	9.9	1442	8.1
	2500*	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
 3',5'DiMe-4NBp 100	0	36	1.0	44	1.0	168	1.0	177	1.0
	10	37	1.0	97	2.2	189	1.1	621	3.5
	20	35	1.0	103	2.3	217	1.3	699	3.9
	100	42 ^b	1.2	138	3.1	255 ^b	1.5	781	4.4
	500	40	1.1	149	3.4	256	1.5	1028	5.8
	2500*	36	1.0	100	2.3	247	1.5	673	3.8
 3',5'Di-tBu-4NBp 101	0	36	1.0	44	1.0	168	1.0	177	1.0
	10	35	1.0	49	1.1	205	1.2	216	1.2
	20	35	1.0	46	1.0	229	1.4	242	1.4
	100	39 ^b	1.1	45	1.0	231 ^b	1.4	224 ^b	1.3
	500	36	1.0	47	1.1	232	1.4	214	1.2
	2500*	39	1.1	42	1.0	209	1.2	222	1.3

* Ausfall, effektive Dosis geringer als angegeben. ^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

In Abwesenheit von S9-Mix war nur 3'Me-4NBp **99** stark positiv in beiden Stämmen (TA98 und TA100), während die 3',5'-dimethylsubstituierte Verbindung **100** ohne S9 fast gar keine Aktivität zeigte, nicht einmal im höchsten Konzentrationsbereich. Auch hinsichtlich der Cytotoxizität war 3'Me-4NBp **99** am stärksten aktiv und bewirkte in der höchsten Dosierung ein Absterben aller Revertanten. In Analogie zur vorhergehenden Testreihe erhöhte der Zusatz von S9-Mix wieder die Mutagenität beider methylsubstituierter Verbindungen (**99**, **100**) in TA98+S9 und TA100+S9. Unter diesen Bedingungen wurde jetzt auch 3',5'DiMe-4NBp **100** mäßig aktiv. 3',5'-Di-tBu-4NBp **101** mit seinen beiden großen *tert*-Butylgruppen blieb in beiden Stämmen sowohl ohne als auch mit zugesetztem Enzymsystem inaktiv und bestätigte damit den mutagenitätsvermindernden Effekt großer Alkylgruppen aus der vorangegangenen Testserie.

Um die Mutagenitätsreduktion durch große Alkylgruppen in der 4'-Position von 4NBp zu überprüfen, wurden in Testserie **2-III** (Tabelle 31) unter anderem 4'Ad-4NBp **102** mit dem extrem raumfüllenden Adamantylsubstituenten und 4NTp **103**, ein 4-Nitrobiphenyl mit einem zusätzlichen Phenylrest, untersucht. Die Tests wurden aufgrund der geringen Löslichkeit in THF als Lösungsmittel durchgeführt.

Tabelle 31: Mutagenitätsdaten von 4'-substituierten 4-Nitrobiphenylen und Azanitrobiphenylen

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 2-III)					
		TA98 -S9		+S9		TA100 -S9	
Positiv-Kontrolle ^a		2757/2940		1579/1945		1019/1051	
Negativ-Kontrolle ^b	THF/ DMSO	39/33 ⁺		61/51		123/179	
 4'Ad-4NBp 102	0	39	1.0	61	1.0	123	1.0
	20	32	0.8	56	0.9	146	1.2
	50	31	0.8	50	0.9	145	1.2
	100	28	0.7	50	0.8	139	1.1
	500	30	0.8	55	0.8	148	1.2
	1000	28 ^c	0.7	56	0.9	182 ^b	1.5
 4NTp 103	0	39	1.0	61	1.0	123	1.0
	20	41	1.0	123	2.0	149	1.2
	50	35	0.9	109	1.8	156	1.3
	100	36	0.9	102	1.7	154	1.3
	500	34	0.9	99	1.6	160 ^b	1.3
	1000	43 ^c	1.1	108	1.8	157	1.3
 2Ph5NP 104	0	39	1.0	61	1.0	123	1.0
	8	47	1.2	71	1.2	185	1.5
	31	85	2.2	143	2.3	321	2.6
	125	219	5.6	341	5.6	905 ^b	7.4
	500	764 ^b	20	730	12	1110	9.0
	1000	614	16	301	4.9	759	6.1
 4'tBu-2Ph5NP 105	0	39	1.0	61	1.0	123	1.0
	8	37	1.0	56	0.9	157	1.3
	31	34	0.9	52	0.9	208	1.7
	125	34	0.9	52	0.9	219 ^b	1.8
	500	37	0.9	52	0.9	250	2.0
	1000	122 ^b	3.1	52	0.9	301	2.5
 5Ph2NP 106	0	33	1.0	51	1.0	179	1.0
	12.5	48	1.5	94	1.8	171	1.0
	25	63	1.9	116	2.3	187	1.0
	50	85	2.6	143	2.8	206	1.1
	100	148	4.5	161	3.2	209 ^d	1.2
	500	778	23.8	616 ^d	12.1	234	1.3
 4'tBu-5Ph2NP 107	0	33	1.0	51	1.0	179	1.0
	12.5	31	0.9	57	1.1	188	1.1
	25	32	1.0	59	1.2	174	1.0
	50	42	1.3	63	1.2	199	1.1
	100	43	1.3	68 ^d	1.3	183 ^d	1.1
	500	32	1.0	61	1.2	99	1.3

⁺ Der Test erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. ^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b THF 50 µl (**103** - **105**) DMSO 50 µl (**106** - **107**) ^c Kein positiver Anstieg ^d Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

Wie die niedrigen Induktionsfaktoren und Revertantenzahlen zeigen, bestätigte die Adamantylverbindung **102** die vorhergehenden Ergebnisse in vollem Umfang. In keinem der beiden Teststämme wurde bei irgendeiner Konzentration mutagenes Verhalten beobachtet, sondern nur schwache Cytotoxizität (in TA98). Interessanterweise erwies sich auch 4NTp **103** in Abwesenheit von S9-Mix als nicht mutagen. In Gegenwart der metabolischen Aktivierung lagen

die Revertanzahlen von **103** deutlich höher und erreichten in TA98 das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes bereits bei niedrigen Konzentrationen. Allerdings stiegen die Revertanzahlen nicht weiter an, so daß keine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung gefunden wurde. Hier spielen cytotoxische Effekte eine Rolle. In Gegenwart von S9-Mix muß 4NTp **103** also als mutagen eingestuft werden.

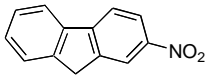
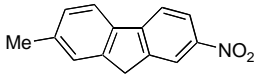
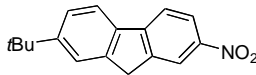
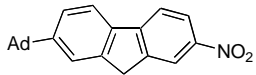
In Testreihe **2-III** (Tabelle 31) wurden zusätzlich einige heteroaromatische Verbindungen aufgenommen, die mit 4-Nitrobiphenyl **1** eng verwandt sind. 2Ph5NP **104** und 4*t*Bu-2Ph5NP **105** unterscheiden sich von ihren Strukturanalogen 4NBp **1** und 4*t*Bu-4NBp **97** nur dadurch, daß in das Biphenylgerüst in der 2-Position ein Stickstoffatom eingebaut ist. Bei 5Ph2NP **106** und 4*t*Bu-5Ph2NP **107** ist nach demselben Prinzip ein CH-Fragment in der 3-Position ersetzt. Die Tests erfolgten bei **104** und **105** in THF und bei **106** und **107** in DMSO. Die höchste Testkonzentration lag bei 1000 µg.

Ähnlich wie 4NBp **1** war 2Ph5NP **104** stark mutagen in beiden Stämmen sowohl mit als auch ohne Zusatz von S9-Mix, und bei Konzentrationen über 500 µg traten zusätzlich cytotoxische Effekte auf. In sehr guter Übereinstimmung mit 4*t*Bu-4NBp **97** war auch 4*t*Bu-2Ph5NP **105** viel weniger mutagen als der Grundkörper und zeigte keine (+S9) bzw. schwache (-S9) Aktivität in TA98. In TA100 war diese Reduktion der Mutagenität ebenfalls klar erkennbar, aber weniger ausgeprägt als bei TA98. In TA100+S9 überschritten die Induktionsfaktoren bei Konzentrationen > 500 µg das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes. Erstaunlicherweise beobachtete man bei 5Ph2NP **106** nur in TA98 (±S9) hohe Mutagenität, während in TA100-S9 die Zahl der Revertanten gar nicht und in TA100+S9 im Vergleich zu 4NBp **1** nur relativ schwach anstieg (5Ph2NP: IFⁱ 2.1 bei 100 µg; 4NBp: IF 3.8 bei 100 µg). Das entsprechende *tert*-Butyl-Derivat **107** bestätigte die mutagenitätsreduzierende Wirkung in TA98 eindrucksvoll (keine Aktivität bei ±S9-Mix) und auch in TA100 war 4*t*Bu-5Ph2NP nur in Gegenwart von S9-Mix schwach aktiv. In der höchsten Testkonzentration (500 µg) traten cytotoxische Effekte auf. Obwohl schon der Grundkörper unter diesen Bedingungen wenig aktiv war, führte die Einführung der *tert*-Butylgruppe hier allerdings im Gegensatz zu den anderen *tert*-Butylverbindungen nicht zu einer weiteren Reduktion der Mutagenität. Im Hinblick auf den Einfluß des S9-Mix ergab sich bei allen heteroaromatischen Verbindungen (**104** - **107**) wie bei den 4-Nitrobiphenylderivaten insgesamt wieder eine mutagenitätsverstärkende Wirkung. Diese war in TA98 relativ schwach ausgeprägt, aber in TA100 recht deutlich.

ⁱ IF = Induktionsfaktor

In einer weiteren Serie wurden die 7-Alkyl-2-nitrofluorene **3**, **108** - **110** untersucht (Testserie 2-IV, Tabelle 32). Aufgrund der schlechten Löslichkeit der alkylierten Derivate in DMSO erfolgte der Test wieder mit THF als Lösungsmittel. Da bekannt war, daß 2-Nitrofluorene ein sehr hohes mutagenes Potential haben, wurden im Ames-Test speziell niedrige Konzentrationen berücksichtigt, um genügend Meßpunkte im linearen Dosis-Wirkungs-Bereich zu erhalten.

Tabelle 32: Mutagenitätsdaten von 7-alkylierten 2-Nitrofluorenen

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 2-IV)					
		TA98 -S9	+S9		TA100 -S9	+S9	
Positiv-Kontrolle ^a		1794		1428	836		1774
Negativ-Kontrolle	THF	33		38	134		114
 2NF 3	0	33	1.0	38	1.0	134	1.0
	2,5	285	8.6	260	6.8	208	1.6
	5	551	16.7	600	15.8	261	1.9
	10	615	18.6	809	21.3	365	2.7
	20	1512 ^b	45.8	1244	37.7	834 ^b	6.2
	50	1605	48.6	2196	66.5	0	0.0
 7Me-2NF 108	0	33	1.0	38	1.0	134	1.0
	5	671	20.1	753	20.0	379	2.8
	10	761 ^b	22.8	800	21.2	422 ^b	3.1
	20	834	25.0	858	22.8	475	3.5
	50	906	27.2	1810	48.1	475	3.5
	100	1960	58.8	2394	63.6	702	5.2
 7tBu-2NF 109	0	33	1.0	38	1.0	134	1.0
	5	43	1.3	62	1.6	130	1.0
	10	57	1.7	68	1.8	149	1.1
	20	61 ^b	1.8	88	2.3	155	1.2
	50	76	2.3	98	2.6	189 ^b	1.4
	100	67	2.0	119	3.2	214	1.6
 7Ad-2NF 110	0	33	1.0	38	1.0	134	1.0
	5	32	1.0	46	1.2	133	1.0
	10	33	1.0	46	1.2	141	1.1
	20	38	1.1	47	1.2	118	0.9
	50	45 ^b	1.4	52	1.4	134	1.0
	100	47	1.4	58 ^c	1.5	126 ^c	0.9

^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde. ^c Kein positiver Anstieg gefunden.

Der Grundkörper 2-Nitrofluoren 2NF **3** und sein 7-Methylderivat **108** waren – in Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen¹⁹⁵ – sehr stark mutagen in beiden Teststämmen. Die extrem hohen Revertanzahlen in TA98 deuten an, daß diese flachen Moleküle vor allem als Frameshift-Mutagene agieren. Bei Zusatz von S9-Mix stieg die Mutagenität von 2NF **3** in TA100+S9 signifikant an und die Cytotoxizität ging zurück. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Bildung von ringhydroxylierten 2-Nitrofluorenen zurückzuführen, auf deren hohes mutagenes Potential ja bereits in Kapitel B.2 hingewiesen worden ist. Die Methylverbindung

108 erwies sich in TA100+S9 – im Gegensatz zu TA100-S9 – schon ab Konzentrationen über 5 µg pro Platte als hochgradig cytotoxisch, während in TA98 mit und ohne S9-Mix nur geringe Aktivitätsunterschiede auftraten. Ähnlich wie in den vorherigen Testreihen führte die Einführung der *tert*-Butylgruppe (7*t*Bu-2NF **109**) zu einer klaren Reduktion der Aktivität in TA98, unabhängig davon, ob S9-Mix zugesetzt war oder nicht. 7Ad-2NF **110** mit seinem sterisch noch anspruchsvolleren Adamantylrest zeigte sogar bei keiner der getesteten Konzentrationen in TA98±S9 mutagene Aktivität. Derselbe Trend wurde auch in TA100 beobachtet: So erwiesen sich ohne S9-Mix weder 7*t*Bu-2NF **109** noch 7Ad-2NF **110** als aktiv. In Gegenwart von S9 war die Mutationsreduktion insgesamt schwächer ausgeprägt. 7*t*Bu-2NF **109** war zwar weniger mutagen als 2-NF **3**, erreichte aber trotz der *tert*-Butylgruppe schon bei der kleinsten Testkonzentration (5 µg) das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes. Auch 7Ad-2NF **110** wurde durch den S9-Mix geringfügig aktiviert, blieb aber insgesamt sehr schwach mutagen (TA100+S9).

In Tabelle 33 sind die beschriebenen Substituenteneffekte in Gegenwart und Abwesenheit von metabolischer Aktivierung anhand des mutagenen Potentials in Revertanten/(10 nmol) noch mal direkt miteinander verglichen. Das mutagene Potential wurde wie üblich durch Regressionsanalyse des linearen Dosis-Wirkungs-Bereichs berechnet.

Tabelle 33: Überblick über die Mutagenitäten para-alkylierter Nitroaromaten

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4NBp	1	3.81	6.81	11.60	21.04
4'Me-4NBp	94	2.39	12.27	2.41	29.25
4'Et-4NBp	95	1.06	3.75	2.39	13.08
4'iPr-4NBp	96	0.11	0.11	< 0.10	5.01
4' <i>t</i> Bu-4NBp	97	< 0.10	0.12	0.21	0.20
4' <i>n</i> Bu-4NBp	98	0.69	0.30	1.34	0.90
4'Ad-4NBp	102	< 0.10	< 0.10	0.11	0.31
4NTp	103	< 0.10	2.32 ^a	0.13 ^b	1.74 ^a

^a Daten unsicher: schlechte Linearität. ^b Kein positiver Anstieg gefunden.

Tabelle 33: Überblick über die Mutagenitäten para-alkylierter Nitroaromaten - Fortsetzung

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
3'Me-4NBp	99	1.49	3.84	6.34	12.21
3',5'DiMe-4NBp	100	0.12	1.61	1.71	8.80
3',5'Di <i>t</i> Bu-4NBp	101	0.11	< 0.10	1.31	0.72
2Ph5NP	104	2.90	2.61	12.42	15.01
4' <i>t</i> Bu-2Ph5NP	105	0.21	< 0.10 ^b	1.63	3.04
5Ph2NP	106	3.02	2.17	0.74	5.65
4' <i>t</i> Bu-5Ph2NP	107	0.33	0.39	0.14	4.38
2NF	3	146.90	165.01	71.31	80.0
7Me-2NF	108	156.65	171.61	64.94	nicht bestimmbar
7 <i>t</i> Bu-2NF	109	3.82	6.22	3.13	50.0
7Ad-2NF	110	0.93	0.70	< 0.10	7.17

^a Daten unsicher: schlechte Linearität. ^b Kein positiver Anstieg gefunden.

Abb. 86: Überblick über die Mutagenitäten para-alkylierter 4-Nitrophenyle

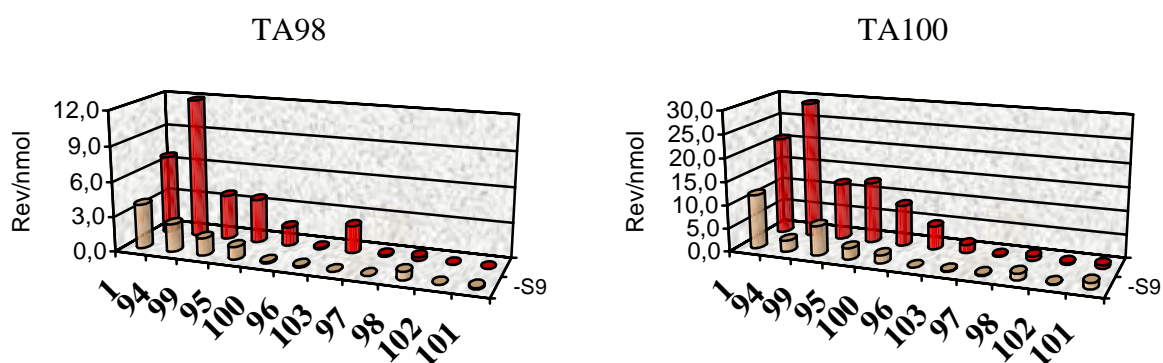
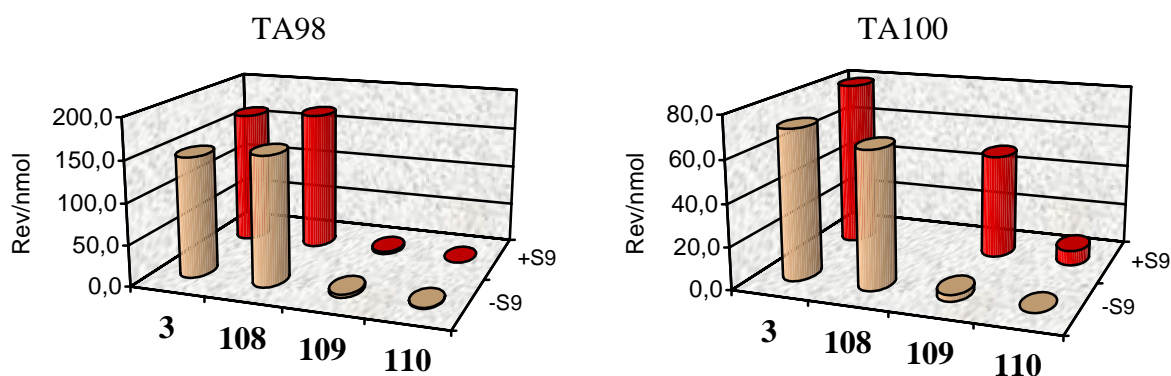


Abb. 87: Überblick über die Mutagenitäten para-alkylierter 2-Nitrofluorene



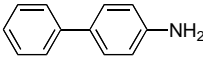
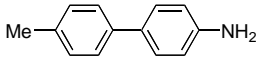
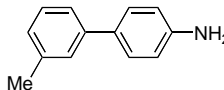
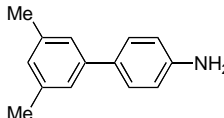
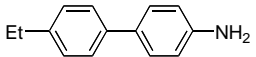
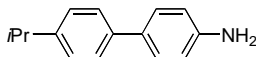
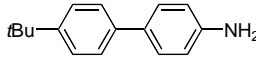
Als Ergebnis dieser Untersuchungen bleibt festzuhalten, daß *para*-Alkylgruppen, die weit weg von der Nitrogruppe lokalisiert sind, genauso wie *ortho*-Alkylgruppen einen größenabhängigen Effekt auf die Mutagenität von Nitroaromaten wie 4NBp **1**, 2Ph5NP **104**, 5Ph2NP **106** und 2NF **3** zeigen. Große Alkylgruppen wie *iso*-Propyl (**96**), *tert*-Butyl (**97**, **101**, **105**, **107**, **109**) und Adamantyl (**102**, **110**) bewirken eine Reduktion oder sogar die völlige Auslöschung der Mutagenität. Die Aktivitätsverminderung ist dabei in TA98 deutlicher ausgeprägt als in TA100, und in Abwesenheit des Metabolisierungszusatzes stärker als in dessen Gegenwart. Kleine *para*-Alkylsubstituenten (Methyl, Ethyl) beeinflussen die Mutagenität der Grundkörper in Abwesenheit des Metabolisierungszusatzes im allgemeinen nur wenig. Es fällt aber auf, daß in Gegenwart von S9-Mix die Mutagenität dieser Verbindungen überdurchschnittlich stark erhöht wird.

F.3.3 Ergebnisse – Aminoaromaten

Bei der Mutagenese von Aminoaromaten treten zwar dieselben metabolischen Zwischenstufen wie bei Nitroaromaten auf, diese werden jedoch durch unterschiedliche Aktivierungsprozesse gebildet (Amine: N-Hydroxylierung \Leftrightarrow Nitroaromaten: Reduktion), an denen z.T. unterschiedliche Enzyme beteiligt sind (vgl. B.2). Wie sieht es mit der Reduktion der Mutagenität durch große Alkylreste in *para*-Position aus? Ist dieser Effekt spezifisch für Nitroaromaten – wird also vielleicht nur die enzymatische Nitroreduktion durch die Alkylreste gehemmt – oder treten ähnliche Effekte auch bei *para*-Alkyl-substituierten Aminen auf?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden neben den Nitroaromaten auch einige der von ihnen abgeleiteten Amine getestet. In Testserie **3-I** (Tabelle 34) wurde der Einfluß von Alkylgruppen in der 4'-Position (Methyl **111**, Ethyl **114**, *iso*-Propyl **115**, *tert*-Butyl **116**), in der 3'-Position (Methyl **112**) und in der 3',5'-Position (Dimethyl **113**) auf die Mutagenität von 4-Aminobiphenyl 4ABp **2** untersucht. Der Vollständigkeit halber sind in Tabelle 34 zusätzlich zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tests auch einige Daten von Glende¹⁵¹ (**114**, **115**) mitaufgenommen worden. Alle Verbindungen waren in DMSO ausreichend löslich und wurden in einem Konzentrationsbereich von 10 µg bis 2500 µg getestet. Bei den stärker hydrophoben Verbindungen **114** (4'Et-4ABp), **115** (4'-iPr-4ABp) und **116** (4'tBu-4ABp) traten in der höchsten Dosierung jeweils Substanzniederschläge auf.

Tabelle 34: Mutagenitätsdaten von alkylierten 4-Aminobiphenylen

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 3-I)							
		TA98 -S9		+S9		TA100 -S9		+S9	
Positiv-Kontrolle ^a		1383/2767		1005/1890		813/916		1241/1759	
Negativ-Kontrolle	DMSO	25/36		78/44		115/168		144/177	
 4ABp^c 2	0	25	1.0	78	1.0	115	1.0	144	1.0
	10	33	1.4	275	3.5	112	1.0	470	3.3
	20	33	1.4	442	5.7	130	1.1	709	4.9
	100	34	1.5	722	9.3	131	1.1	1103	7.7
	500	36	1.6	889	11.4	154	1.3	916	6.4
	2500	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
 4'Me-4ABp 111	0	25	1.0	78	1.0	115	1.0	144	1.0
	10	42	1.7	328	4.2	128	1.1	333	2.3
	20	46	1.9	557	7.1	126	1.1	587	4.1
	100	50	2.0	1303	16.7	135	1.2	1397	9.7
	500	29	1.2	1583	20.3	102	0.9	1438	10.0
	2500	0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0
 3'Me-4ABp 112	0	25	1.0	78	1.0	115	1.0	144	1.0
	10	30	1.2	405	5.2	117	1.0	868	6.0
	20	34	1.4	678	8.7	120	1.0	1333	9.3
	100	31	1.2	1263	16.2	130	1.1	1611	11.2
	500	0	0.0	849	10.9	0	0.0	322	2.2
	2500	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
 3',5'DiMe-4ABp 113	0	25	1.0	78	1.0	115	1.0	144	1.0
	10	33	1.3	246	3.2	117	1.0	491	3.4
	20	34	1.3	307	3.9	115	1.0	732	5.1
	100	39	1.6	630	8.1	113	1.0	1359	9.5
	500	0	0.0	580	7.4	69	0.6	188	1.3
	2500	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
 4'Et-4ABp^b 114	0	36	1.0	44	1.0	168	1.0	177	12.0
	10	49	1.3	95	2.2	184	1.1	359	2.0
	20	44	1.2	118	2.7	235	1.4	465	2.6
	100	40	1.1	270	6.1	268	1.6	917	5.2
	500	0	0.0	59	1.3	0	0.0	105	0.6
	2500*	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
 4'iPr-4ABp^b 115	0	36	1.0	44	1.0	168	1.0	177	1.0
	10	42	1.2	50	1.1	195	1.2	257	1.5
	20	35	1.0	62	1.4	248	1.5	263	1.5
	100	35	1.0	87	2.0	274	1.6	412	2.3
	500	0.0	0.0	29	0.7	0	0.0	0	0.0
	2500*	0.0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
 4'tBu-4ABp 116	0	25	1.0	78	1.0	168	1.0	144	1.0
	10	27	1.0	77	1.0	196	1.2	142	1.0
	20	32	1.3	86	1.1	230	1.4	173	1.2
	100	28	1.1	89	1.1	219	1.3	233	1.6
	500	30	1.2	92	1.2	78	0.5	130	0.9
	2500*	20	0.8	76	1.0	0	0.0	0	0.0

* Ausfall, effektive Dosis geringer als angegeben. ^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Daten von Glende. ^c Daten skaliert auf gleiche Spontanrevertantenzahl.

Wie bereits in Abschnitt F.1 gezeigt, erwies sich der Grundkörper 4-ABp **2** in Gegenwart von S9-Mix in beiden *Salmonella*-Stämmen als stark mutagen. Auf die hohe Cytotoxizität dieser

Verbindung ist ebenfalls schon hingewiesen worden. Dieses Phänomen trat auch bei allen anderen Aminen auf und stellt damit einen wichtigen Unterschied zu den entsprechend substituierten Nitroaromaten dar, bei denen cytotoxische Effekte weit weniger ausgeprägt waren. Tatsächlich ist die stärker bakterientötende Wirkung von aromatischen Aminen im Vergleich zu Nitroaromaten auch aus anderen Arbeiten bekannt. Die Einführung eines Methylsubstituenten in den zweiten Phenylring führte jeweils zu einem Anstieg der Mutagenität in Gegenwart von S9-Mix, unabhängig davon, ob der sich Substituent in der 4'- oder 3'-Position (**111**, **112**) befand. Verbindung **113** mit zwei Methylgruppen war dagegen wieder ungefähr genauso mutagen wie der unsubstituierte Grundkörper, während die sterisch etwas anspruchsvollere Ethylgruppe eine geringe Aktivitätsverringering zur Folge hatte. Dennoch induzierte 4'Et-4ABp **114** immer noch so viele Revertanten, daß bereits in der niedrigsten Testkonzentration Induktionsfaktoren von mehr als 2 erreicht wurden. Ähnlich wie bei den Nitroaromaten bewirkte erst die Anwesenheit der großen Alkylreste einen auffälligen Rückgang der Mutagenität in TA98+S9 und TA100+S9. 4'iPr-4ABp **115** war nur schwach mutagen, erreichte aber bei einer Konzentration von 100 µg in beiden Stämmen das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes. 4'tBu-4ABp **116** mit der raumfüllenden *tert*-Butylgruppe war in Analogie zu den übrigen Ergebnissen wieder am wenigsten aktiv und zeigte in TA98+S9 gar keine und in TA100+S9 sehr geringe Mutagenität. In TA98+S9 wurden zudem kaum cytotoxische Effekte beobachtet.ⁱ

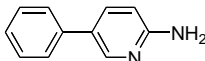
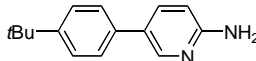
Ohne Zusatz des Metabolisierungssystems zeigten die meisten Amine erwartungsgemäß kein mutagenes Verhalten, da ohne Enzymkatalyse die entsprechenden Hydroxylamine nicht gebildet werden. Die schwach genotoxische Reaktion, die bei einigen Verbindungen dennoch auftrat (z.B. 4ABp **2**, 4'Me-4ABp **111** in TA98-S9 oder 4'Et-4ABp **114**, 4'iPr-4ABp **115** in TA100-S9) ist möglicherweise auf eine *in situ* Oxidation der Amine zurückzuführen. Da der Ames-Test nicht unter anaeroben Bedingungen durchgeführt wurde, haben sich wahrscheinlich während der Inkubationsphase (37 °C) durch Sauerstoffzutritt entsprechende Oxidationsprodukte (Nitrosoverbindungen, Hydroxylamine) gebildet, die dann nach dem üblichen Mechanismus ihr genotoxisches Potential entfalten. Auf die leichte Oxidierbarkeit der Amine wurde schon in Kapitel E mehrfach hingewiesen.

Aufgrund der limitierten Testkapazität konnte der Einfluß von großen Alkylgruppen nur an einem heteroaromatischen System (5-Phenyl-2-aminopyridin) anhand der Verbindungen **117**

ⁱ Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf einen Test von 4'Ad-4ABp, das genau wie das Nitroanalogon ebenfalls keine Aktivität zeigen sollte, verzichtet.

(5Ph2AP) und **118** (4'*t*Bu-5Ph2AP) überprüft werden (Testserie **3-II**, Tabelle 35). In exzellenter Übereinstimmung zu Untersuchungen von Sugimura²¹² erwies sich auch 5Ph2AP **117** als stark mutagen in beiden Teststämmen in Gegenwart von S9-Mix. Dabei war die Aktivität von **117** in TA98+S9 deutlich größer und in TA100+S9 etwas kleiner als die von 4ABp **2** ohne Stickstoffsubstituent im Ringgerüst. 5Ph2AP **117** wirkte also primär als Frameshift-Mutagen. Ähnlich wie bei den aromatischen 4-Aminobiphenylen führte die *tert*-Butylgruppe wieder zu einem starken Mutagenitätsrückgang, so daß 4'*t*Bu-5Ph2AP **118** in keinem Stamm Aktivität zeigte.

Tabelle 35: Mutagenitätsdaten von 5-Phenyl-2-aminopyridinen

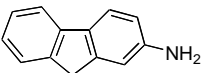
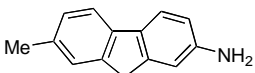
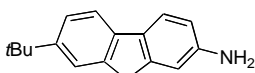
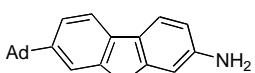
Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 3-II)							
		TA98				TA100			
		-S9		+S9		-S9		+S9	
Positiv-Kontrolle ^a		2940		1945		1051		2336	
Negativ-Kontrolle	DMSO	33		51		179		156	
 5Ph2AP 117	0	33	1.0	33	1.0	179	1.0	156	1.0
	12.5	29	0.9	885	17.4	200	1.1	527	3.4
	25	36	1.1	1144	22.4	180	1.0	652	4.2
	50	40	1.2	1323	25.9	193	1.1	796	5.1
	100	39	1.2	1406	27.6	195	1.1	714	4.6
	500	42	1.3	723	14.2	240	1.3	471	3.0
 4' <i>t</i> Bu-5Ph2AP 118	0	33	1.0	51	1.0	179	1.0	156	1.0
	12.5	40	1.2	55	1.1	194	1.1	158	1.0
	25	37	1.1	62	1.2	155	0.9	169	1.1
	50	38	1.2	60	1.2	119	0.7	161	1.0
	100	21	0.7	50	1.0	117	0.7	108	0.7
	500	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg.

In einer weiteren Testserie wurden 7-alkylierte 2-Aminofluorene untersucht (Testserie **3-III**, Tabelle 36). Der Grundkörper 2AF **4** zeigte in einem Vorversuch die erwartete, sehr hohe Mutagenität in Gegenwart von S9-Mix in beiden Teststämmen. Die im Vergleich zu TA100+S9 weitaus höheren Induktionsfaktoren in TA98+S9 belegen, daß auch 2AF **4** genau wie das Nitroderivat 2NF **3** hauptsächlich als Frameshift-Mutagen wirkt. Ähnliche Aktivitätsunterschiede zwischen TA98+S9 und TA100+S9 sind aus den meisten anderen Mutagenitätsstudien von 2AF bekannt.²¹³ Vereinzelt sind jedoch auch in TA100+S9 vergleichbar hohe Mutagenitäten wie in TA98+S9 beobachtet worden.²¹⁴ In diesem Test traten bei Konzentrationen ab 100 µg die üblichen cytotoxischen Effekte auf, bei 2500 µg starben alle Revertanten ab. Um möglichst viele Meßpunkte im linearen Dosis-Wirkungsbereich auswerten zu können, erfolgte der Ames-Test der übrigen Verbindungen (7Me-2AF **119**, 7*t*Bu-2AF **120**, und 7Ad-2AF **121**) in einem Dosisbereich bis maximal 500 µg mit mehr Messungen bei geringen Kon-

zentrationen. Da hierbei die Anzahl der Spontanrevertanten deutlich größer war als beim Test des Grundkörpers (bis zu Faktor 1.75 bei TA100-S9), wurden zur besseren Vergleichbarkeit alle Ergebnisse auf dieselben Spontanrevertantenzahlen skaliert. 7Me-2AF **119** erwies sich als noch stärker mutagen als der Grundkörper und ergab beispielsweise in TA98+S9 schon bei 5 µg einen Induktionsfaktor von 20! Die kleine Methylgruppe scheint also die Wirkung als Frameshift-Mutagen, bei der das Amin zwischen die DNA-Basen geschoben wird, nicht zu beeinträchtigen.

Tabelle 36: Mutagenitätsdaten von 7-alkylierten 2-Aminofluorenen

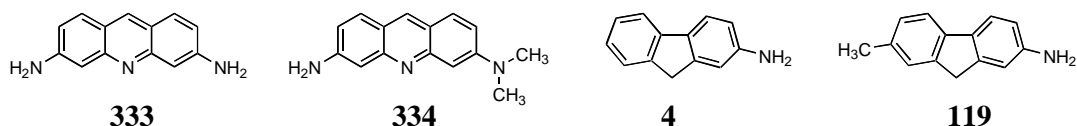
Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 3-III)							
		TA98 -S9		+S9		TA100 -S9		+S9	
Positiv-Kontrolle ^a		1794		1428		836		1241	
Negativ-Kontrolle	DMSO	30		68		129		173	
 2AF 4	0	30	1.0	68	1.0	129	1.0	173	1.0
	10	81	2.7	1622	24.0	132	1.0	902	5.2
	20	136	4.5	2078	30.7	142	1.1	1438	8.3
	100	417	13.9	1999	29.5	183	1.4	287	1.7
	500	784	26.1	1194	17.6	223	1.7	286	1.7
	2500 [*]	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
 7Me-2AF^b 119	0	30	1.0	68	1.0	129	1.0	173	1.0
	5	91	3.1	1417	20.8	127	1.0	476	2.8
	10	102	3.4	2250	33.1	124	1.0	885	5.1
	20	120	4.0	3214	47.3	124	1.0	1407	8.1
	100	328	11.0	3777	55.6	178	1.4	683	3.9
	500	435	14.7	2319	34.1	12	0.1	223	1.3
 7tBu-2AF^b 120	0	30	1.0	68	1.0	129	1.0	173	1.0
	5	28	1.0	90	1.3	140	1.1	228	1.3
	10	30	1.0	108	1.6	125	1.0	310	1.8
	20	33	1.1	122	1.8	129	1.0	434	2.5
	100	37	1.2	223	3.3	139	1.1	619	3.6
	500	40	1.3	337	5.0	221	1.7	734	4.2
 7Ad-2AF^b 121	0	30	1.0	68	1.0	129	1.0	173	1.0
	5	42	1.4	70	1.0	113	0.9	209	1.2
	10	30	1.0	74	1.1	111	0.9	204	1.2
	20	34	1.1	82	1.2	115	0.9	214	1.2
	100	32	1.1	104	1.5	116	0.9	219	1.3
	500	33	1.1	250	3.7	276	2.1	315	1.8

* Ausfall. ^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Revertantenzahlen auf dieselbe Anzahl von Spontanrevertanten skaliert.

Betrachtet man die Testergebnisse von **4**, **119** - **121** ohne S9-Mix, fällt auf, daß 2AF **4** und 7Me-2AF **119** erstaunlicherweise bereits ohne metabolische Aktivierung in TA98 hohe Revertantenzahlen induzierten, während in TA100 unter diesen Bedingungen keine oder sehr geringe Genotoxizität auftrat. Offensichtlich ist die Mutagenität von 2AF **4** und 7Me-2AF **119** in TA98 nicht allein an die N-Hydroxylierung und damit an die Adduktbildung mit der DNA gebunden, sondern kann auch durch andere Mechanismen ausgelöst werden. Wahrscheinlich

sind hierfür reine Interkalationsvorgänge ohne Bindung an die DNA verantwortlich. Solche Interkalationen kennt man von strukturell vergleichbaren Verbindungen wie dem Proflavin **333** oder dem Acridin-Orange **334** (Abb. 88). Diese planaren mehrkernigen Moleküle lagern sich in die DNA ein, indem sie mit den Nukleobasen π -Komplexe bilden, die bei der Replikation zu Frameshift-Mutationen führen.²¹⁵

Abb. 88: Interkalierende Stoffe vom Acridin-Typ



Auch bei den 2-Aminofluorenen dieser Testserie bewirkte die Einführung sterisch anspruchsvoller Gruppen eine starke Reduktion der Mutagenität in beiden Teststämmen (Tabelle 36). Besonders deutlich war dieser Effekt in TA98+S9: Während im Ames-Test von 7Me-2AF **119** bei einer Konzentration von 100 μg beispielsweise ein Faktor von 55.6 auftrat (und das im bereits cytotoxischen Bereich), ergab dieselbe Dosierung bei der *tert*-Butyl-Verbindung 7*t*Bu-2AF **120** nur einen Faktor von 3.3 und bei der Adamantylverbindung **121** sogar nur 1.5. In TA100 zeigte 7*t*Bu-2AF **120** ebenfalls deutlich geringere Mutagenität als der Grundkörper. Die Revertanzahlen von 7Ad-2AF **121** blieben sogar bei allen Dosierungen unter dem Doppelten des Lösungsmittelkontrollwertes.

Wie im vorangegangenen Abschnitt ist das mutagene Potential aller *para*-Alkyl-substituierten Amine in Revertanten/(10 nmol) in Tabelle 37 zusammengefaßt. Da ohne S9-Mix keines der Amine – abgesehen von 2AF **4** und 7Me-2AF **119** – signifikante Mutagenität aufwies, wurde auf die Aktivitätsangabe ohne S9-Mix verzichtet.

Tabelle 37: Überblick über die Mutagenitäten *para*-alkylierter Aminoaromaten

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4ABp	2	-	30.80	-	47.81
4'Me-4ABp	111	-	43.85	-	40.55
3'Me-4ABp	112	-	54.93	-	108.85
3',5'DiMe-4ABp	113	-	22.59	-	57.99
4'Et-4ABp	114	-	7.30	-	28.41
4'iPr-4ABp	115	-	1.90	-	0.91
4'tBu-4ABp	116	-	0.24	-	2.04

Tabelle 37: Überblick über die Mutagenitäten para-alkylierter Aminoaromaten - Fortsetzung

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
5Ph2AP	117	-	74.41	-	20.00
4 <i>t</i> Bu-5Ph2AP	118	-	0.41	-	0.27
2AF	4	-	182.15	-	114.64
7Me-2AF	119	-	295.16	-	121.71
7 <i>t</i> Bu-2AF	120	-	3.36	-	31.44
7Ad-2AF	121	-	1.14	-	0.55

Abb. 89: Überblick über die Mutagenitäten para-alkylierter 4-Aminobiphenyle

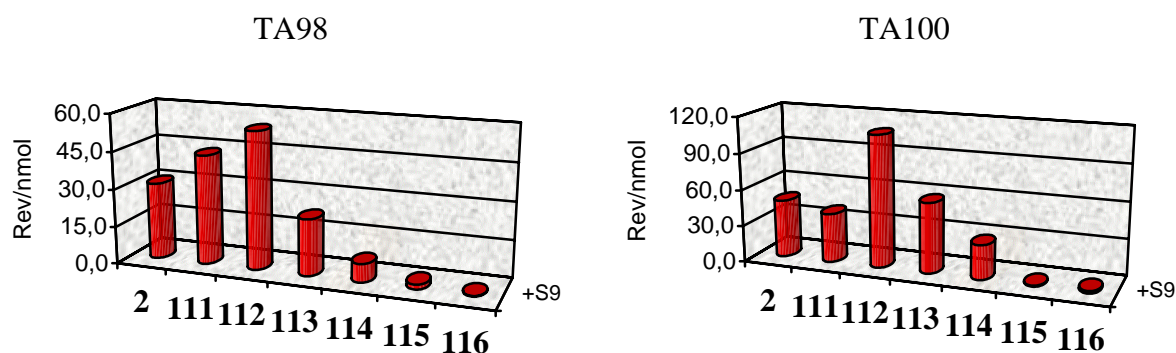
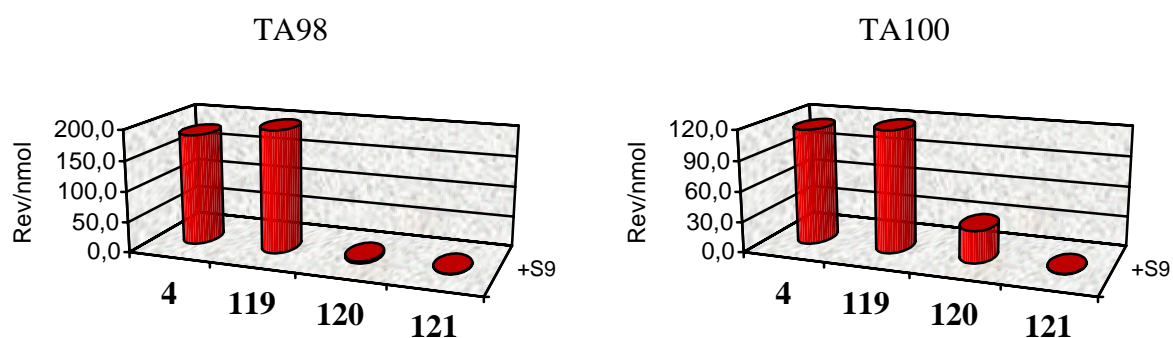


Abb. 90: Überblick über die Mutagenitäten para-alkylierter 2-Aminofluorene



Fazit: Die Mutagenitätsdaten der Amine bestätigen den größenabhängigen Effekt der weit entfernten Alkylgruppen, der bei den Nitroaromaten entdeckt worden ist, in vollem Umfang. Während die kleinen Methylgruppen die Mutagenität der Grundkörper 4ABp **2** und 2AF **4** in Gegenwart von S9-Mix erhöhen, reduzieren die größeren Alkylgruppen (besonders *tert*-Butyl und Adamantyl) die Mutagenität dramatisch. Selbst das extrem mutagene 2AF **4** kann durch Einführung solcher Substituenten in schwach bzw. nicht mutagene Derivate (**120**, **121**) über-

führt werden. Auch bei den Aminen reagiert TA98 insgesamt etwas empfindlicher auf den sterischen Einfluß der Alkylreste als TA100.

F.3.4 Diskussion

Wie lassen sich diese Effekte durch Alkylgruppen, die gleichermaßen bei aromatischen Amino- und Nitroverbindungen auftreten, nun verstehen? Hauptverantwortlich für den Rückgang der Mutagenität müssen offensichtlich sterische Wechselwirkungen sein.

Gerade bei den Verbindungen mit einem sehr großen aliphatischen Strukturanteil (4'Ad-4NBp **102**, 3',5'Di*t*Bu-4NBp **101** oder 7Ad-2NF **110**) sollten jedoch noch andere Ursachen bedacht werden. Große Alkylgruppen verändern nicht nur den sterischen Anspruch von Molekülen, sondern erhöhen auch ihre Hydrophobie sehr stark (vgl. Kapitel G.1). Wie der bilineare Verlauf der Mutagenität in Abhängigkeit von der Hydrophobie in den QSAR-Gleichungen für Nitroaromaten zeigt (vgl. D.4, Abb. 23), scheinen sehr stark hydrophobe Verbindungen mit log P-Werten von deutlich > 7 generell nur schwach aktiv zu sein. Für Aminoaromaten wurde ein entsprechendes Phänomen zwar bisher nicht beschrieben, wahrscheinlich ist dies aber darauf zurückzuführen, daß bei der Entwicklung der entsprechenden Gleichungen keine genügend hydrophoben Aminderivate zur Verfügung standen.ⁱ Die geringe Aktivität von sehr hydrophoben Verbindungen könnte ausschließlich eine Folge ihrer geringen Wasserlöslichkeit sein. Die Sättigungskonzentration der elektrophilen Metaboliten von Verbindungen wie **101**, **102** und **110**, die alle log P-Werte > 7 haben, ist möglicherweise so gering, daß eine stärkere Adduktbildung ausbleibt. Außerdem ist nicht bekannt, ob diese Moleküle überhaupt in der Lage sind, die Bakterienzellwand zu durchdringen und zur DNA zu gelangen.

Der starke Aktivitätsrückgang bei den *para*-Alkyl-substituierten Verbindungen mit nur einem *iso*-Propyl- oder *tert*-Butylsubstituenten kann auf diese Weise jedoch nicht erklärt werden. Diese Verbindungen weisen – je nach Grundkörper – log P-Werte zwischen 4 und 6 auf. Ein reiner Löslichkeitseffekt kann hier also mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Nach den QSAR-Untersuchungen sind bei Nitroaromaten log P-Werte um 6 sogar optimal für eine stark mutagene Wirkung.

Im Gegensatz zu den weiter oben diskutierten *ortho*-alkylierten Amino-/Nitroaromaten sind *para*-Alkylgruppen weit entfernt von der funktionellen Gruppe und können diese daher nicht direkt beeinflussen. Auch die Konformation der Nitrogruppe wird durch *para*-Alkylreste nicht verändert. Obwohl es nicht völlig ausgeschlossen werden kann, daß sterisch anspruchs-

ⁱ Aromatische Amine sind hydrophiler als entsprechende Nitroaromaten.

volle *para*-Alkylgruppen bereits die Bindung an die Redoxenzyme stören und damit den gesamten Prozeß der Mutagenese verlangsamen, ist es unwahrscheinlich, daß eine Inhibierung der oxidativen oder reduktiven Aktivierung allein für die starke Mutagenitätsreduktion der Nitroaromaten 4'*i*Pr-4NBp **96**, 4'*t*Bu-4NBp **97**, 4'*t*Bu-2Ph5NP **105**, 4'*t*Bu-5Ph2NP **107** und 7*t*Bu-2NF **109** oder der Amine 4'*i*Pr-4ABp **115**, 4'*t*Bu-4ABp **116**, 4'*t*Bu-2Ph5AP **118** und 7*t*Bu-2AF **120** verantwortlich ist. So haben die in Abschnitt D.4 vorgestellten QSAR-Studien zur Bindung an das P450-Redoxsystem keinerlei Hinweise auf einen sterischen Einfluß von *para*-Alkylgruppen geliefert, obwohl bei diesen Untersuchungen durchaus sterisch anspruchsvolle Substrate miteinbezogen worden sind.⁹⁰ Auch bei der Reduktion von Nitrobenzolderivaten durch Xanthin-Oxidase spielen nach einer Studie von Tatsumi sterische Faktoren keine oder allenfalls eine untergeordnete Rolle.^{216,111}

Ein weiterer Beleg dafür, daß sterische anspruchsvolle Substituenten eher einen anderen Schritt der Mutagenese beeinflussen, ergibt sich aus den Mutagenitätsdaten der entsprechenden Nitrosoderivate¹⁵² in Tabelle 38. Trotz der Tatsache, daß die Nitrosoverbindungen bereits aktiviert sind und sehr leicht in die Hydroxylamine überführt werden können, bewirkte der *tert*-Butylsubstituent immer noch eine erstaunlich deutliche Reduktion der Mutagenität. So erwies sich 4-Nitrosobiphenyl (4NOBp **89**) in beiden Stämmen hochmutagen, während das *para-tert*-Butylderivat (4'*t*Bu-4NOBp **335**) jeweils viel weniger mutagen war (TA98: Faktor 12, TA100: Faktor 6).

Tabelle 38: Mutagenitäten alkylierter 4-Nitrosobiphenyle

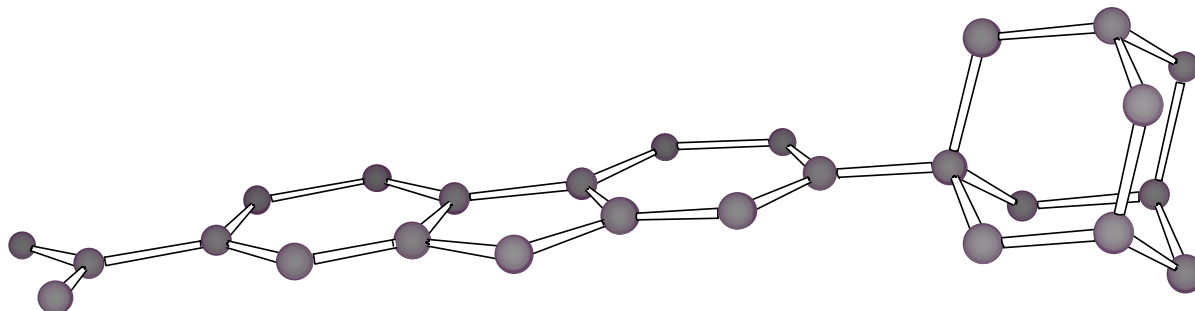
Verbindung		Revertanten/(10 nmol) ^a			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4NOBp	89	35.22	-	73.05	-
4' <i>t</i> Bu-4NOBp	335	2.93	-	13.24	-

^a Die angegebenen Mutagenitäten in Revertanten/nmol wurden auf Grundlage von Ames-Untersuchungen von Haack berechnet.

Bereits in Abschnitt D.3.1 ist darauf hingewiesen worden, daß die Planarität eines aromatischen Systems eine wichtige Struktureigenschaft ist, damit ein solches Molekül als Frameshift-Mutagen wirken und in die DNA interkalieren kann. Diese Annahme wurde durch die Ames-Tests der 2-Nitro-/2-Aminofluorene **3**, **4**, **108** und **119** in dieser Arbeit untermauert. So waren die flachen Moleküle 2NF **3**, 2AF **4** und auch deren Methylderivate 7Me-2NF **108** und 7Me-2AF **119** in TA98±S9 sehr viel stärker aktiv als die entsprechenden, weniger flachen Biphenylverbindungen 4NBp **4**, 4ABp **2**, 4'Me-4NBp **94** und 4'Me-4ABp **111** (die Dieder-

winkel zwischen den Phenylgruppen betragen etwa 40°). Durch die Einführung von raumfüllenden Alkylgruppen geht auch die Planarität der Fluorene insgesamt verloren. Dies ist an der Kristallstruktur von 7-Adamantyl-2-nitrofluoren 7Ad-2AF **121**, die im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt wurde, klar zu erkennen.

Abb. 91: Kristallstruktur von 7-Adamantyl-2-nitrofluoren



Konsequenterweise verlieren Verbindungen mit *iso*-Propyl, *tert*-Butyl oder Adamantylresten ihre Fähigkeit, zwischen die DNA-Basen zu interkalieren und damit ihre mutagenen Eigenschaften in TA98. Besonders beeindruckend ist ein Vergleich von 4'Me-4NBp **94** mit 4'*t*Bu-4NBp **97**, von 7Me-2NF **108** mit 7*t*Bu-2NF **109** bzw. von den entsprechenden Aminen. Relativ geringe Veränderungen – nämlich der Austausch einer Methyl- gegen eine *tert*-Butylgruppe – überführen ein hochgradig mutagenes Molekül in einen schwach oder nicht mutagenen Stoff. Diese Verringerung der Aktivität wird nur durch Modifikation der molekularen Form bewirkt, während die chemische Reaktivität der Amino- oder Nitrogruppe, die elektronischen Eigenschaften des Grundkörpers oder das Ausmaß an Aromatizität weitgehend unbeeinflusst bleiben.

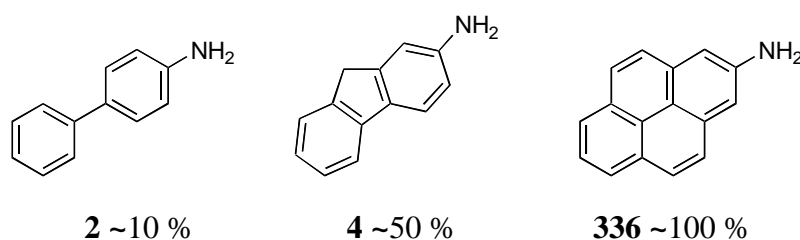
In TA100 werden statt Frameshift-Mutationen Basen-Substitutionsreaktionen detektiert. Die Planarität des Mutagens sollte daher insgesamt deutlich weniger wichtig sein. Setzt man einmal voraus, daß *para*-Alkylgruppen weder die NO₂-Reduktion noch die NH₂-Oxidation bzw. die Adduktbildung selbst signifikant inhibieren, würde man in TA100 relativ ähnliche Induktionsraten für alle Verbindungen erwarten.ⁱ Dennoch zeigten die experimentellen Daten, daß es auch in TA100 einen deutlichen sterischen Effekt gibt. Spielt die Planarität der Verbindungen also hier ebenfalls eine Rolle?

In Kapitel B.3 wurde ausgeführt, daß die meisten aromatischen Amine und Nitroverbindungen, darunter 4-Amino-/4-Nitrobiphenyle und 2-Amino-/2-Nitrofluorene, *in vivo* und *in vitro*

ⁱ Auch hier könnte die geringe Aktivität der extrem hydrophoben Verbindungen durch die geringe Löslichkeit erklärt werden.

hauptsächlich C8-Desoxyguanosinaddukte bilden. Auch auf die konformative Heterogenität als Ursache für unterschiedliche Mutationsraten bei verschiedenen Addukten wurde bereits hingewiesen. Tatsächlich ist die Existenz von unterschiedlichen Konformeren bei DNA-Oligonukleotiden mit C8-Desoxyguanosinaddukten von 4-Aminobiphenyl,²¹⁷ 2-Aminofluoren,²¹⁸ N-Acetyl-2-aminofluoren^{219,220} oder 1-Aminopyren²²¹ durch NMR-Studien (¹H, ¹³C, ¹⁹F) und Computersimulationen zweifelsfrei bewiesen. Es konnte auch gezeigt werden, daß sich diese Konformationen bei 37 °C ineinander umwandeln können.²²² In der Literatur werden zwei Klassen von Konformationen unterschieden: Bei den sogenannten "B-type"-Konformeren ragt der aromatische Rest des Addukts in die große oder kleine Furche der DNA-Doppelhelix und verändert die Gesamtstruktur der DNA relativ wenig. Anders bei den "stacked"-Konformeren, bei denen der Adduktkörper in die Helix insertiert ist und die ursprüngliche Position des Guanosins einnimmt, während die Base selbst nach außen (in die DNA-Furche) gedreht wird.²²² Man nimmt an, daß insbesondere solche strukturell stark gestörten Konformere für eine hohe Mutationsrate bei der Replikation verantwortlich sind.²²² Das Verhältnis der Konformere zueinander hängt dabei vom Mutagen selbst (Größe, Planarität, Stereochemie), von der Bindung an die DNA (Basentyp, Bindungsstelle C8, N², etc.), aber auch von der Basensequenz um das Addukt ab. Beim direkten Vergleich von Addukt-modifizierten DNA-Oligonukleotiden beobachtete Cho, daß C8-Guanosin-Adduktbildung mit 7-Fluor-2-aminofluoren zur Einstellung einer 45:55 Mischung von "stacked"- zu "B-type"-Konformeren führte, während dieselben Oligonukleotide mit 4'-Fluor-4-aminobiphenyladdukten ausschließlich in der "B-type"-Konformation vorlagen.²²² Nach dieser und ähnlichen Studien deutet alles darauf hin, daß der Anteil der "stacked"-Konformere mit zunehmender Interkalationsfähigkeit der Addukte generell zunimmt. Für Addukte von 4-Aminobiphenyl **2**, 2-Aminofluoren **4** und 2-Aminopyren (2AP) **336** hat man beispielsweise folgende Anteile von "stacked"-Konformeren ermittelt:²²²

Abb. 92: Einfluß der Struktur auf die Konformation (Anteil "stacked"-Konformation)



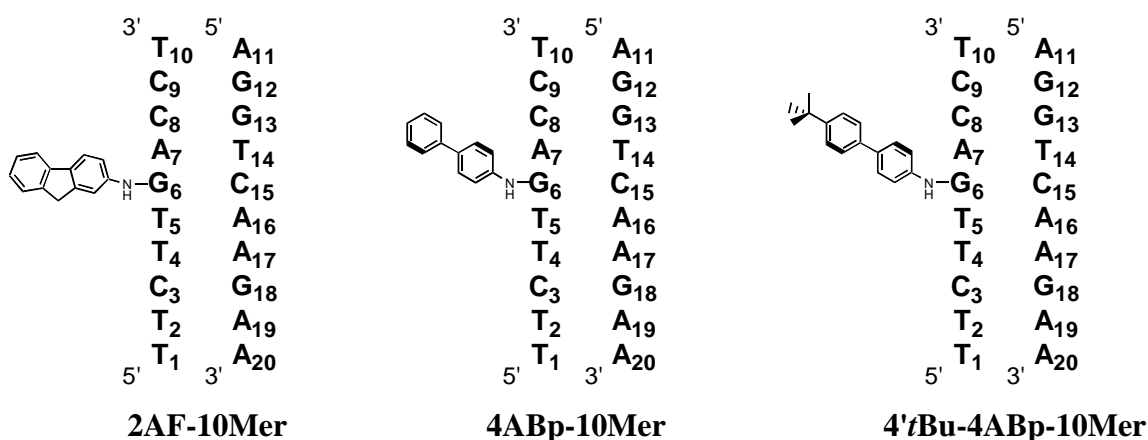
Wenn bereits die Struktur des Grundkörpers einen so deutlichen Einfluß auf das Verhältnis der DNA-Konformationen ausübt, ist davon auszugehen, daß auch Substituenten, die die Molekülform verändern, einen ähnlichen Einfluß haben. Besonders bei Addukten mit großen

Alkylresten, die aus dem flachen aromatischen System ein ausgeprägt dreidimensionales Gebilde machen, sind starke sterische Wechselwirkungen mit der DNA denkbar, die die Fähigkeit zur Interkalation und damit die konformative Freiheit einschränken. Durch Störung der Interkalation sollte das Verhältnis der Konformere zugunsten des "B-type"-Konformers verschoben werden. Wahrscheinlich sind solche Einflüsse auf die konformative Heterogenität für das geringere mutagene Potential der Amino-/Nitroaromaten mit sperrigen Alkylresten im Ames-Test verantwortlich.

F.3.5 Analyse von Konformationen

Um mehr über den sterischen Einfluß von verschiedenen Addukten, insbesondere solchen mit Alkylsubstituenten, auf die konformative Heterogenität zu erfahren, wurden mit dem Programm MACROMODEL V.6 umfangreiche Kraftfeldrechnungen an Addukt-modifizierten DNA-Oligomeren durchgeführt. Als Grundlage diente das Decamer d[TTCTTGACCT] d[AGGTCAAGAA], das sich von dem von Cho verwendeten Oligomer ableitet,²²² aber aus Gründen der Rechengeschwindigkeit an beiden Enden um je eine Base verkürzt wurde.ⁱ

Abb. 93: Aufbau der berechneten DNA-Decamere



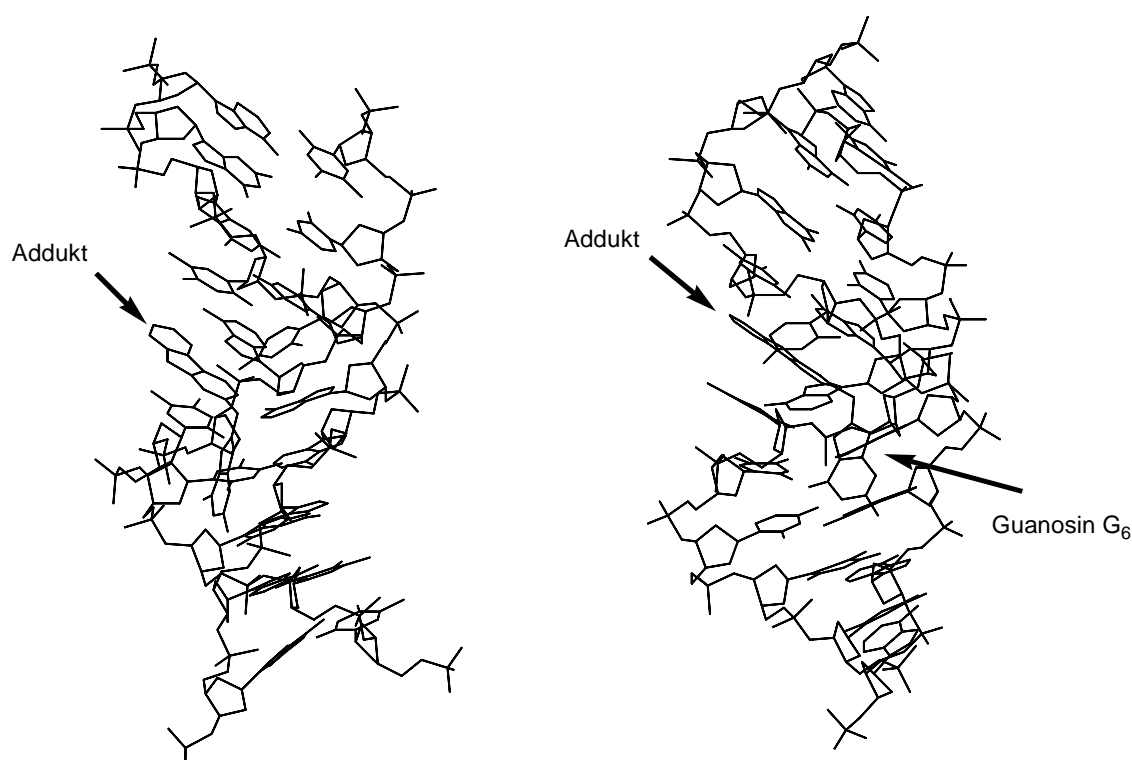
Ausgehend von einer ungestörten Doppelhelix in B-Form (Konstruiert mit MACROMODEL) wurden an die C8-Position des Guanosins (G₆) Addukte des planaren 2-Aminofluorens (**2AF-10Mer**) und der weniger planaren Verbindungen 4-Aminobiphenyl (**4ABp-10Mer**), bzw. 4'-tert-Butyl-4-aminobiphenyl (**4'tBu-4ABp-10Mer**) gehängt. Die C8-Position des Guanosins ist in der nicht modifizierten B-DNA für potentielle Mutagene leicht zugänglich. Da eine auch nur annähernd vollständige Analyse des Konformationsraumes für die hier betrachteten ex-

ⁱ Eine weitere Verkürzung des Stranges ist nicht sinnvoll. Studien an kleineren Addukt-modifizierten DNA-Oligomeren haben gezeigt, daß es hier zu Wechselwirkungen zwischen dem Addukt und den DNA-Enden kommen kann, die bei längeren DNA-Strängen nicht auftreten würden.

trem großen Systeme nicht möglich ist, wurde die Suche (siehe dazu im experimenteller Teil I.1.2) auf bestimmte konformative Grundtypen eingeschränkt. Vor allem wurden solche Konformationen berücksichtigt, die sich in vergleichbaren Literaturstudien an anderen DNA-Oligonukleotiden als besonders günstig erwiesen haben. Die Rechnungen erfolgten mit dem AMBER-Kraftfeld, das speziell auf Nukleinsäuren parametrisiert ist, wobei als Lösungsmittel Wasser durch ein dielektrisches Feld simuliert wurde.ⁱ

Tatsächlich konnten mit dieser Methode eine Reihe energieärmer Konformere erhalten werden, die sich strukturell stark, aber energetisch nur wenig unterschieden. Exemplarisch sollen die wichtigsten Merkmale dieser Strukturen anhand der 2AF-modifizierten Stränge erläutert werden. Die beiden energetisch günstigsten Konformationen – darunter auch das globale Minimum – waren in diesem Fall sehr ähnlich und sollen zum Typ 1 zusammengefaßt werden.

Abb. 94: Addukt-modifizierte DNA – Typ 1ⁱⁱ



Im globalen Minimum war die 2-Aminofluoreneinheit in die Helix zwischen die Basen T₅ und A₇ insertiert und nahm dort die Position des Guanosins G₆ ein. Dieses selbst wurde in die kleine Furche verdrängt (in 5'-Richtung relativ zum eigenen Strang). Da das Addukt deutlich

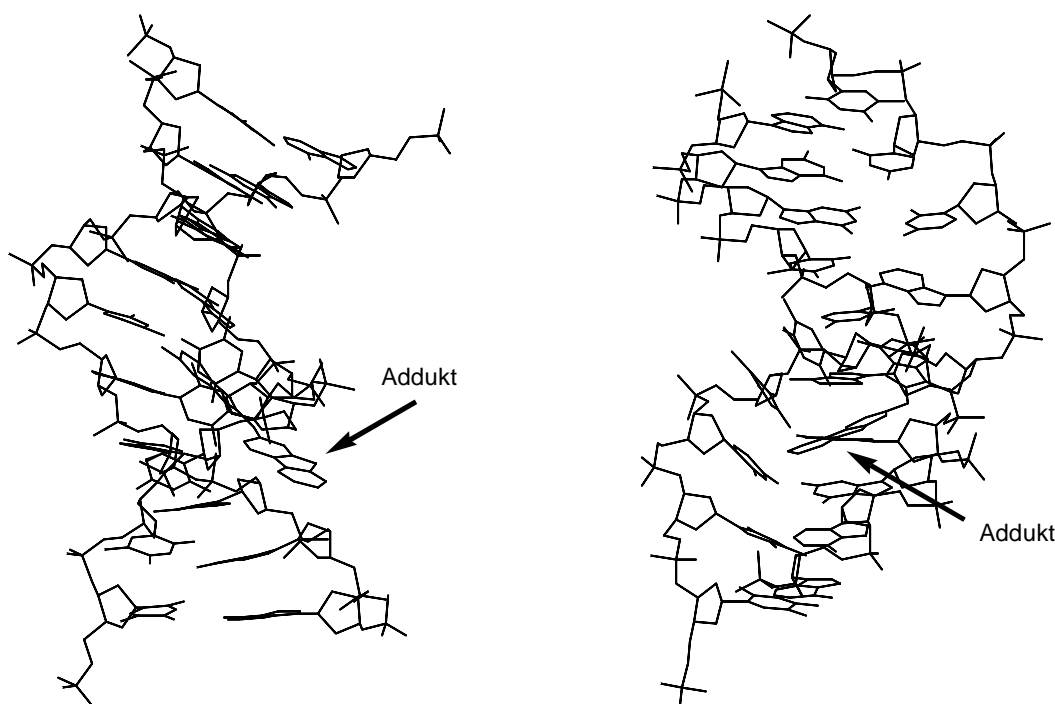
ⁱ Diese Berechnungen waren extrem zeitaufwendig. So dauerte die Bestimmung der energieärmsten Konformationen für einen Grundtyp pro Addukt mehrere Wochen.

ⁱⁱ In Abb. 89 ist eine Konformation (Typ 1a – siehe Text) in zwei Perspektiven dargestellt. Dasselbe gilt für die Abbildungen 90 und 91.

größer als das Guanosin ist, war auch die Position des zu G_6 komplementären C_{15} betroffen: C_{15} ragte in dieser Konformation teilweise in die große Furche. Abgesehen von den Nukleobasen G_6 und C_{15} blieben die Wasserstoffbrückenbindungen aller anderen komplementären Basen erhalten. Nur zwischen T_5 und A_{16} , die direkt unterhalb des Addukts gebunden sind, wurde die Bindung geschwächt (größerer Abstand). Außerdem fiel auf, daß die DNA an der Stelle, wo das insertierte Addukt lag, einen Knick von fast 45° machte. Solche Abwinkelungen sind schon häufiger an modifizierter DNA beobachtet worden.²²¹ Das 2-Aminofluoren konnte innerhalb dieser Konformation verschiedene Orientierungen annehmen, je nachdem ob die Methylenbrücke nach innen (Typ 1b) oder nach außen zeigte (Typ 1a). Energetisch unterschieden sich die Konformere jedoch praktisch nicht. Insgesamt muß diese Konformation dem "stacked"-Typ zugeordnet werden. Nolan hat vor kurzen eine ganz ähnliche Konformation an einem 1-Aminopyren-modifizierten Oligomer beschrieben.²²¹

Eine völlig andere Strukturvariante (Typ 2) ist in Abb. 95 dargestellt. Das günstigste Konformer dieses Typs war nur um 1.8 kJ/mol weniger stabil als das globale Minimum (Typ 1a). Im Gegensatz zu Typ 1 wiesen Konformere des Typ 2 nur geringe Störungen verglichen mit der nicht modifizierten DNA (B-DNA) auf.

Abb. 95: Addukt-modifizierte DNA – Typ 2

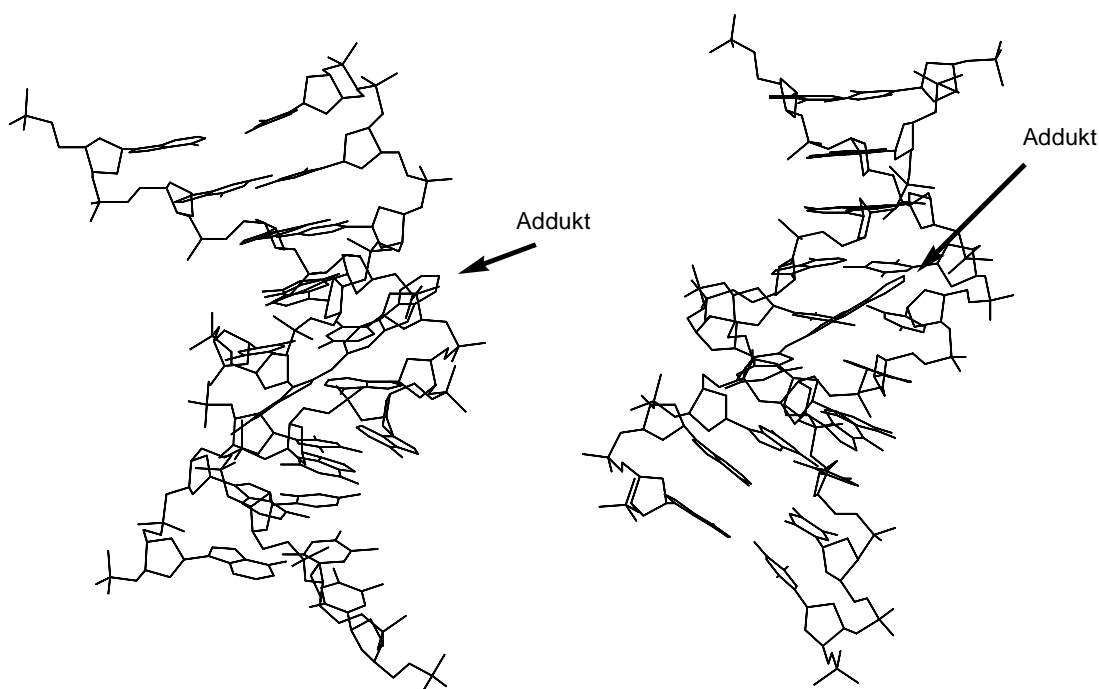


Das Addukt war in diesem Fall in die kleine Furche der DNA (in 5'-Richtung) gezwängt und dadurch vom hydrophilen Lösungsmittel abgeschirmt. Dieser Effekt scheint relativ wichtig zu sein: Konformationen, die sich vom dargestellten Fall nur darin unterschieden, daß der

2-Aminofluorenrest weiter ins Lösungsmittel ragte, waren nämlich deutlich ungünstiger. Die normalen Watson-Crick-Wasserstoffbindungen zwischen allen DNA-Paaren blieben in diesem Strukturtyp weitgehend erhalten. Durch den eingezwängten Adduktrest wurde der Abstand der Zucker-Phosphat-Stränge allerdings aufgeweitet. Um diesen Effekt zu kompensieren, konnten sich die komplementären Basen im dem Bereich, wo das Addukt lag, nicht in einer Ebene anordnen, sondern standen abgewinkelt zueinander. Diese Abwinkelung wurde aber mit zunehmendem Abstand vom Addukt immer kleiner, so daß beim Basenpaar T₁-A₂₀ bereits wieder eine nahezu planare Anordnung möglich war. Wie bei Typ 1 konnte das 2-Aminofluoren zwei Orientierung in der kleinen Furche einnehmen. Die Anordnung, bei der die Methylengruppe nach außen zeigte (Typ 2a), war im Vergleich zu Typ 2b (Methylenbrücke nach innen gerichtet) etwas stabiler (0.5 kJ/mol). Insgesamt trat auch hier eine Verbiegung der DNA-Helix auf, die aber weit weniger ausgeprägt war, als in der oben vorgestellten Struktur. Konformationen dieses Typs, die ebenfalls in der Literatur beschrieben worden sind,²¹⁷ können dem "B-type" zugeordnet werden.

Ein dritter Strukturtyp (Typ 3), der ebenfalls nur um 2.0 kJ/mol über dem globalen Minimum lag, ist in Abb. 96 abgebildet.

Abb. 96: Addukt-modifizierte DNA – Typ 3



In dieser Struktur waren sowohl das Addukt als auch das modifizierte Guanosen halb in die Helix insertiert und halb in den Bereich der kleinen Furche verschoben. Das Addukt ragt dabei in 3'- und das Guanosen in 5'-Richtung (bezogen auf den modifizierten Strang). Diese Ver-

schiebung hatte für die benachbarten Basen weitreichende Folgen. Aufgrund der veränderten Orientierung und Position innerhalb der Helix kam es nämlich zur Ausbildung völlig untypischer Basenpaarungen. Adenin A₁₆ bildete Wasserstoffbrücken nicht mehr mit Thymin T₅, sondern mit dem modifizierten Guanosin G₆ und Thymin T₅ selbst war mit Cytosin C₁₅ gepaart. Außerdem war die Konformation des Guanosins um die glycosidische Bindung betroffen. Während G₆ in Typ 2 und in unmodifizierter DNA in einer *anti*-Konformation vorgelegen hatte,ⁱ nahm es nun eine *syn*-Konformation ein. Nach Beland sollen solche *syn*-Konformationen die Wahrscheinlichkeit von Frameshift-Mutationen erhöhen.¹⁹⁸ Auch bei diesem Strukturtyp konnten wieder zwei Orientierungen des Aminofluorens unterschieden werden (Typ 3a: Methylenbrücke zeigte nach außen, Typ 3b: Methylenbrücke zeigte zur Helix), die energetisch aber gleichwertig waren. Erstaunlicherweise wurden alle anderen Basenpaarungen von diesen starken Strukturänderungen überhaupt nicht betroffen und blieben völlig intakt. Genau wie Konformere des ersten Typs (Typ 1), müssen Strukturen dieser Art (Typ 3) zur Klasse der "stacked"-Konformere gerechnet werden.

Zusätzlich zu den beschriebenen Typen wurden noch eine Reihe anderer Strukturen gefunden, bei denen das 2AF gar nicht, teilweise oder ganz in die DNA insertiert war. Die meisten Konformationen waren jedoch deutlich energiereicher und sollen hier nicht diskutiert werden. Die Computeranalyse der 2AF-modifizierten DNA-Oligomere bestätigte also die konformative Heterogenität, die im Experiment von Cho gefunden worden war.²²² Alle vorgestellten Konformationen waren energetisch ähnlich stabil und sollten daher in vergleichbarem Ausmaß populiert sein.

Die Konformationssuche bei den DNA-Oligomeren mit Addukten von 4-Aminobiphenyl (**4ABp-10Mer**) und 4'-*tert*-Butyl-4-aminobiphenyl (**4'tBu-4ABp-10Mer**) ergab ganz ähnliche Typen wie bei der 2AF-modifizierten DNA. Als günstigste Strukturen erwiesen sich in diesem Fall aber Konformere vom Typ 2 ("B-type"), bei denen die Gesamtstruktur der DNA nahezu intakt blieb. Im Unterschied zum **2AF-10Mer** waren die Addukte weniger weit in die kleine Furche eingezwängt. Speziell beim **4'tBu-4ABp-10Mer** waren die Zuckerphosphatketten zudem stärker aufgeweitet, so daß hier schwächere Wasserstoffbrückenbindungen auftraten. Diese Anordnung war aber immer noch günstiger als die Verschiebung des Addukt ins Lösungsmittel. Interessanterweise bildeten **4ABp-10Mer** und **4'tBu-4ABp-10Mer** auch Konformationen, die weitgehend identisch mit den Typen 1 und 3 waren. Durch geringfügige

ⁱ Die Begriffe *syn* und *anti* beschreiben hier die Konformation der Base um die glycosidische Bindung. Vereinfacht bedeutet *syn*, daß der zweite Ring des Guanosins über den Zucker zeigt. In der *anti*-Konformation liegt dagegen das Addukt über dem Zucker.

Verschiebung der Basen wurden beim **4'*t*Bu4ABp-10Mer** ungünstige Wechselwirkungen der sterisch anspruchsvollen *tert*-Butylgruppe mit dem DNA-Oligomer minimiert, so daß auch hier energetisch sehr günstige Konformationen erhalten wurden.

In der folgenden Tabelle sind die relativen Energien der Konformere 1 - 3 in Abhängigkeit von der Struktur des Addukts miteinander verglichen. Dem energieärmsten Konformer wurde dabei jeweils eine Energie von 0.0 kJ/mol zugeordnet.

Tabelle 39: Vergleich der relativen Stabilitäten der Addukt-modifizierten DNA-Konformationen.

Konformationstyp	2AF-10Mer	4-ABP-10Mer	4' <i>t</i> Bu-4ABP-10Mer
1a ("stacked")	± 0.0 kJ/mol	+ 15.2 kJ/mol	+2.5 kJ/mol
1b ("stacked")	+ 0.5 kJ/mol	-	-
2a ("B-type")	+ 1.8 kJ/mol	± 0.0 kJ/mol	± 0.0 kJ/mol
2b ("B-type")	+ 2.3 kJ/mol	-	-
3a ("stacked")	+ 2.0 kJ/mol	+ 3.0 kJ/mol	+ 5.5 kJ/mol.
3b ("stacked")	+ 2.2 kJ/mol	-	-

Nach Tabelle 39 hat die Struktur der Addukte einen entscheidenden Einfluß auf die relativen Stabilitäten der Konformationen. Offensichtlich führen Änderungen der Adduktstruktur, wie z.B. der Planarität, also tatsächlich zu einer Beeinflussung der Konformere. Während beim **2AF-10Mer** eine "stacked"-Konformation als energieärmste Struktur gefunden wurde, waren bei den Biphenyladdukten jeweils die "B-type"-Konformere am günstigsten. **4'*t*Bu-4ABP-10Mer** und **4ABP-10Mer** sollten daher primär in dieser Konformation vorliegen. Auch bei den Addukten von 4ABp **2** und 4'*t*Bu-4ABp **116** waren die energetischen Unterschiede der verschiedenen Konformationstypen vergleichsweise klein. Beim Vergleich zwischen 4ABp **2** und 4'*t*Bu-4ABp **116** fällt auf, daß die beiden "stacked"-Konformationen relativ zum "B-type"-Konformer durch die zusätzliche *tert*-Butylgruppe nicht weiter destabilisiert werden. Typ 1 ist beim 4'*t*Bu-4ABp **116** sogar – relativ zum Typ 2 – stabiler als Typ 1 beim 4ABp **2**. Die energetische Stabilität der DNA-Konformationen kann also nicht der einzige Faktor sein, der für die unterschiedliche Mutagenität von 4ABp **2** und 4'*t*Bu-4ABp **116** verantwortlich ist.

Obwohl man dieses Ergebnis nicht verallgemeinern kann und in einer anderen DNA-Sequenz sterische Faktoren möglicherweise zu ganz anderen Konsequenzen führen, unterstützt die hier vorgestellte Analyse die These, daß DNA mit sterisch anspruchsvollen Addukten bevorzugt in der "B-type"-Konformation vorliegt. Da Addukt-modifizierte DNA in "B-type"-Konformation

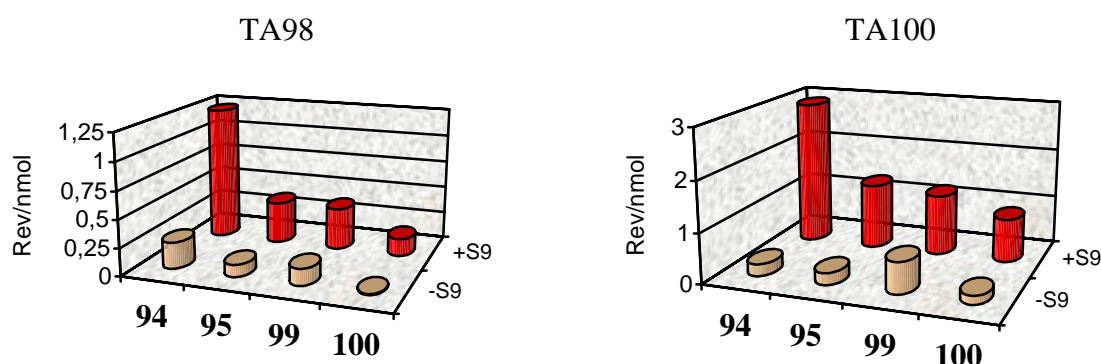
bei der Replikation zu weniger oder vielleicht sogar zu gar keinen Mutationen führt, sollten Verbindungen wie 4ABp **2** und 4*t*Bu-4ABp **116** deutlich weniger mutagen als planare Moleküle wie 2AF **4** sein. Sterisch anspruchsvolle Substituenten (*tert*-Butyl, Adamantyl) könnten zudem die dynamische Umwandlung der Konformationen beeinträchtigen, indem sie die Aktivierungsenergie für diesen Prozeß durch ungünstige sterische Wechselwirkungen erhöhen.

F.4 Einfluß von Hydroxyalkyl-, Bromoalkyl- und Carboxylsubstituenten

F.4.1 Literaturüberblick

In den vorangegangenen Abschnitten ist mehrfach darauf hingewiesen worden, daß die Mutagenität von aromatischen Aminen und Nitroaromaten durch Einführung kleiner Reste wie Methyl- und Ethylgruppen – im Gegensatz zu großen Alkylgruppen – nicht erniedrigt wurde, sondern in Gegenwart von S9-Mix sogar zunahm. Dieses Phänomen wurde in beiden Ames-Stämmen beobachtet. Einige der Methyl- oder Ethylverbindungen waren unter diesen Bedingungen (+S9) sogar deutlich mutagener als der Grundkörper selbst, während die Aktivitätsunterschiede ohne S9-Mix in der Regel recht gering blieben. In der folgenden Abbildung sind die entsprechenden Befunde am Beispiel der 4-Nitrobiphenyl-derivate 4'Me-4NBp **94**, 4'Et-4NBp **95**, 3'Me-4NBp **99** und 3',5'DiMe-4NBp **100** noch mal dargestellt:

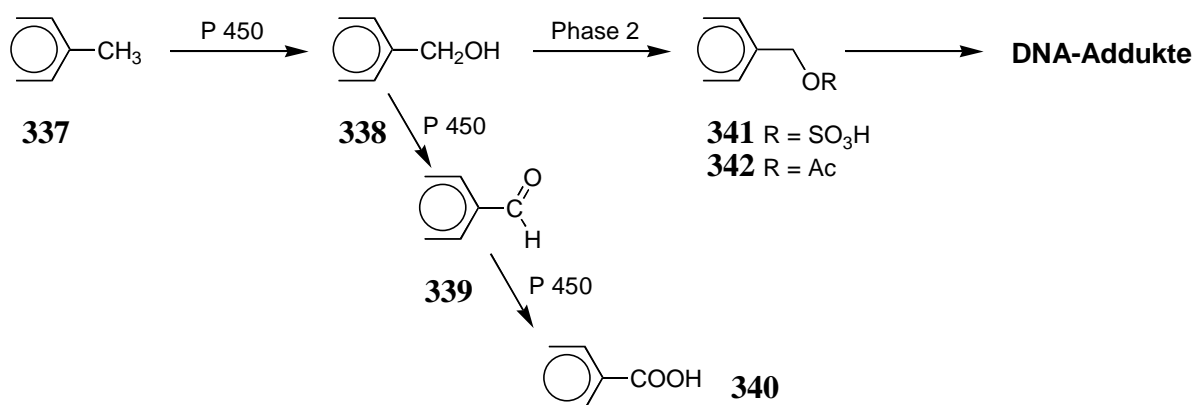
Abb. 97: Wirkung des S9-Mix auf Methyl- und Ethyl-substituierte 4-Nitrobiphenyle



Hilfreich, um die Wirkung des Aktivierungssystems zu verstehen, ist ein Blick auf die methylsubstituierten, polycyclischen Aromaten, bei denen prinzipiell ähnliche Phänomene auftreten. So sind zum Beispiel viele methylierte Fluorene, Pyrene, Chrysene etc. in *Salmonella typhimurium* in Gegenwart von S9-Mix stärker mutagen als ihre unsubstituierten Grundkörper.²²³ Offenbar ist die aktivitätssteigernde Wirkung von Methylgruppen nicht an die Gegenwart von Nitro- oder Aminogruppen gebunden, sondern tritt ganz generell auf.

Es gilt heute als sicher, daß methylierte polycyclische Aromaten **337** durch Hydroxylierung der Benzylposition – eine durch CYP 450 katalysierte Metabolisierungsreaktion²²⁴ – und nachfolgende Veresterung der Hydroxygruppe aktiviert werden²²⁵ (Abb. 98). Eine besonders wichtige Rolle spielt hierbei die Konjugation des Benzylalkohols **338** mit Sulfat (\rightarrow **341**). Weniger gut erforscht ist die Bedeutung der Acetylierung (\rightarrow **342**) oder die oxidative Aktivierung durch Bildung von Aldehyden **339** oder Carbonsäuren **340**.

Abb. 98: Aktivierung von aromatischen Methylgruppen



Tatsächlich geben gerade die Sulfatester **341** von benzyllischen Alkoholen im Ames-Test (-S9) stark positive Ergebnisse²²⁶ und bilden mit der DNA Addukte, die teilweise auch charakterisiert wurden,²²⁷ während die entsprechenden Acetate **342** insgesamt weniger aktiv sind (schlechtere Abgangsgruppe).

Die Benzylalkohole **338** selbst zeigen dagegen auch in Gegenwart von S9-Mix nicht immer positive Ergebnisse, da im Ames-Test normalerweise keine effiziente Sulfatkonjugation stattfindetⁱ und die Acetylierung als Aktivierung offenbar nicht immer ausreichend ist. Erst in Gegenwart von cytosolischen Sulfotransferasen und PAPS erhält man hohe Revertantenzahlen.²²⁸ In Gegenwart von Halogenidionen (Chlorid, Bromid) wird die Aktivität der Sulfatester noch wesentlich verstärkt.²²⁹ Man nimmt an, daß intermediär Benzylhalogenide gebildet werden, die aufgrund ihrer höheren Hydrophobie leichter in die Bakterien eindringen können. Als starke Alkylierungsmittel sind solche benzyllischen Halogenide generell genotoxisch.

Aus Metabolisierungsstudien an *ortho*-, *meta*- und *para*-Nitrotoluolen ist bekannt, daß die Aktivierung von Methylgruppen auch bei methylsubstituierten Nitroaromaten stattfinden kann. Neben der Hydroxylierung der Benzylgruppe hat man hier zusätzlich als Folgereaktion die Oxidation zu Carbonsäuren beobachtet. Beim 4-Nitrotoluol wurden beispielsweise 4-Nitrobenzylalkohol,ⁱⁱ 4-Nitrobenzoesäure und 4-Nitrobenzylsulfat als Metaboliten eindeutig nachgewiesen.³⁶ Einige solcher Metaboliten wie 4-Nitrobenzylacetat und 4-Nitrobenzoesäure sind im Ames-Test deutlich stärker mutagen^{197,230} als das Nitrotoluol selbst, während 4-Nitrobenzylalkohol zumindest in TA100+S9 inaktiv ist.²³⁰

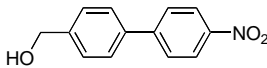
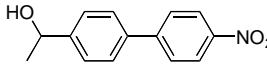
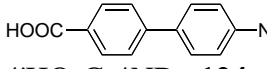
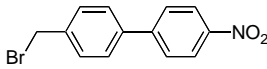
ⁱ Die am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Sulfotransferasen sind hauptsächlich im Cytosol lokalisiert und werden daher nicht in der S9-Fraktion angereichert. Auch PAPS als Coenzym fehlt im S9-Mix.

ⁱⁱ 4-Nitrobenzylalkohol tritt dabei nur intermediär auf und wird durch Konjugation z.B. in 4-Nitrobenzylglucuronid überführt.

F.4.2 Ergebnisse

Es liegt nahe anzunehmen, daß vergleichbare Vorgänge für die erhöhte Mutagenität der Methyl- und eventuell Ethyl-substituierten Amino- und Nitroaromaten in Gegenwart von S9-Mix verantwortlich sind. Da es keine Daten über die Mutagenität der möglichen Metaboliten (Alkohol, Carbonsäure) gab und nicht klar war, ob die Aktivierung der Methylgruppe bei den in dieser Arbeit untersuchten Systemen wirklich zu einer Zunahme der Mutagenität führt, wurden die entsprechenden Verbindungen hier untersucht. In Testserie **4-I** wurden 4'HOCH₂-4NBp **122**, 4'(1HO)Et-4NBp **123** und 4'HO₂C-4NBp **124** als potentielle Metaboliten von 4'Me-4NBp **94** und 4'Et-4NBp **95** zusammengefaßt. 4'BrCH₂-4NBp **125**, das als Metabolit im Ames-Test sicherlich nicht gebildet wird, aber als Modellverbindung für die hydrolyseempfindlichen Sulfate oder Acetate dienen kann,^{231,226} wurde ebenfalls getestet (Tabelle 40).

Tabelle 40: Mutagenitätsdaten der möglichen Metaboliten von 4'Me-4NBp **94** und 4'Et-4NBp **95**

Verbindung	Dosis	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie-4-I)							
		TA98				TA100			
	(µg/Platte)	-S9	+S9		-S9	+S9			
Positiv-Kontrolle ^a		2940	1945		1051	2336			
Negativ-Kontrolle ^b	DMSO	33/28/47	51/38/80		179/182/99	156/193/99			
 4'HOCH ₂ -4NBp 122	0	33	1.0	51	1.0	179	1.0	156	1.0
	6.25	126	3.8	478	9.4	367	2.0	2108	13.5
	12.5	169	5.2	650	12.8	546	3.0	2184 ^b	14.0
	25	338	10.3	957	18.8	837	4.7	1722	11.0
	50	651	19.9	1100	21.6	1216	6.8	729	4.7
	100	1454	44.5	548	10.7	0	0.0	0	0.0
 4'(1OH)Et-4NBp 123	0	28	1.0	38	1.0	182	1.0	193	1.0
	5	45	1.6	169	4.4	254	1.4	312	1.6
	10	77	2.7	244	6.4	356	2.0	437	2.3
	20	75	2.6	250	6.5	412	2.3	593	3.1
	50	179	6.3	0	0.0	750	4.1	1087	5.6
	100	0	0.0	0	0.0	1046	5.7	1920	10.0
500	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	
 4'HO ₂ C-4NBp 124	0	28	1.0	38	1.0	182	1.0	193	1.0
	5	245	8.6	267	7.0	653	3.6	426	2.2
	10	430	15.2	429	11.2	681	3.7	690	3.6
	20	752 ^b	26.5	583	15.2	1020 ^b	5.6	896	4.6
	100	229	8.1	273	7.1	1326	7.3	1323	6.9
	500	0	0.0	0	0.0	1241	6.8	1089	5.7
2500	0	0.0	0	0.0	0	0.0	123	0.7	
 4'BrCH ₂ -4NBp 125	0	47	1.0	80	1.0	99	1.0	99	1.0
	6.25	842 ^b	17.8	379	4.8	297	3.0	624	6.3
	12.5	415	8.8	810 ^b	10.2	610	6.2	850	8.6
	25	370	7.8	977	12.3	687	7.0	931	9.4
	50	270	5.7	635	8.0	1090	11.1	1314	13.3
	100	48	1.0	529	6.6	192	1.9	315	3.2
500	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	

^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

Da die Tests der einzelnen Substanzen (in DMSO) zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgten, unterscheiden sich die Spontanrevertanten teilweise recht stark. Aufgrund der erwarteten hohen Aktivität und Cytotoxizität für die Hydroxymethyl- und die Brommethylverbindung wurde die Dosierung bei **122** und **125** auf maximal 500 µg begrenzt.

Tatsächlich erwies sich 4'-HOCH₂-4NBp **122** als sehr aktiv in beiden *Salmonella* Stämmen und induzierte etwa um den Faktor 10 - 20 höhere Revertantenzahlen als 4'-Me-4NBp **94** ohne Hydroxygruppe. Genau wie bei 4'-Me-4NBp **94** wurde die Mutagenität in Gegenwart von S9-Mix noch wesentlich gesteigert, besonders auffällig in TA100 (Faktor 7!). Abgesehen vom Test in TA98-S9, bei dem man über den gesamten Dosisbereich einen linearer Anstieg der Mutagenität beobachten konnte, kam es in den anderen Fällen zu deutlichen cytotoxischen Reaktionen, die in TA100±S9 jeweils bei 100 µg zu einem vollständigen Absterben der Bakterien führten. Die benzyllische Hydroxygruppe der Ethylverbindung 4'-(1HO)Et-4NBp **123** bewirkte ebenfalls hohe Aktivitäten in TA98 und TA100, die in Gegenwart von S9-Mix weiter zunahmen. In TA100+S9 trat allerdings keine so starke Aktivitätssteigerung auf, wie bei 4'-HOCH₂-4NBp **122**. Aufgrund der Cytotoxizität von **123** starben bei Dosierungen > 50 µg (TA98) bzw. > 100 µg (TA100) alle Bakterien ab.

Bemerkenswerterweise hatte die Anwesenheit der Carboxylgruppe im Vergleich zum entsprechenden Benzylalkohol eine noch weitere Zunahme der Aktivität zur Folge, und die Carbonsäure 4'-HO₂C-4NBp **124** induzierte in Abwesenheit des S9-Mixes noch höhere Revertantenzahlen als 4'-HOCH₂-4NBp **122**. Dabei fällt auf, daß im Gegensatz zum Alkohol **122** gerade bei dieser Verbindung, die selbst nicht weiter oxidiert werden kann, durch Zugabe von S9-Mix keine Erhöhung der Mutagenität auftrat. Auch hier ergaben sich bei höheren Konzentrationen wieder starke cytotoxische Reaktionen. Das stärkste mutagene Potential in TA98 in Abwesenheit von S9-Mix wurde schließlich bei dem Benzylbromidderivat 4'-BrCH₂-4NBp **125** beobachtet, das allerdings unter diesen Bedingungen schon bei 10 µg so sehr cytotoxisch war, daß hier nur ein Meßwert (6.25 µg) verwertet werden konnte. In TA98+S9 und in TA100-S9 erreichte 4'-BrCH₂-4NBp **125** relativ zu 4'-HO₂C-4NBp **124** nur eine geringfügig höhere Mutagenität, in TA100+S9 war es jedoch wieder wesentlich aktiver.

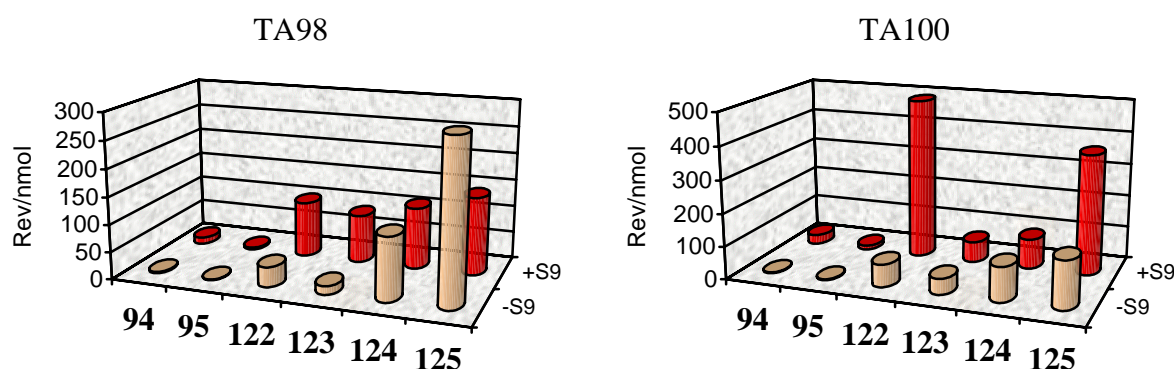
In Tabelle 41 sind die Revertantenzahlen der Verbindungen **122** - **125** denen der normalen 4'-Methyl- und 4'-Ethyl-substituierten 4-Nitrobiphenyle (**94** und **95**) gegenübergestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Mutagenitätsdaten wurden alle Werte auf dieselben Spontanrevertantenzahlen skaliert.

Tabelle 41: Überblick über die Mutagenitäten der möglichen Metaboliten von 4'Me-4NBp **94** und 4'Et-4NBp **95**

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4NBp	1	3.76	6.78	11.55	21.02
4'Me-4NBp	94	2.39	12.27	2.41	29.25
4'Et-4NBp	95	1.06	3.75	2.39	13.08
4'HOCH ₂ -4NBp	122	36.27 ^a	102.57 ^a	69.00 ^a	491.11 ^a
4'(1HO)Et-4NBp	123	15.72 ^a	88.34 ^a	48.13 ^a	63.34 ^a
4'HO ₂ C-4NBp	124	114.97 ^a	112.94 ^a	104.74 ^a	90.83 ^a
4'BrCH ₂ -4NBp	125	292.50 ^a	142.89 ^a	144.60 ^a	366.81 ^a

^a Skaliert auf Spontanrevertantenzahlen vom Test mit 4NBp (Tabelle 29).

Abb. 99: Überblick über die Mutagenitäten der möglichen Metaboliten von 4'Me-4NBp **94** und 4'Et-4NBp **95**



Die experimentellen Daten belegen, daß die potentiellen Metaboliten **122**, **123** und **124**, die durch die Aktivierung des Methyl- oder Ethylsubstituenten gebildet werden können, alle wesentlich stärker mutagen sind als die Ausgangsverbindungen **1**, **94** und **95**. Die Bildung dieser Metaboliten ist also sehr wahrscheinlich für die erhöhte Aktivität von **1**, **94** und **95** in Gegenwart von S9-Mix verantwortlich. Nicht entschieden werden kann, welcher Metabolit genau diesen Effekt verursacht. Aufgrund ihrer sehr viel höheren Aktivität ist jedoch klar, daß es bereits ausreicht, wenn nur wenige Prozent der entsprechenden Verbindungen gebildet werden.

F.4.3 Diskussion

Die hohe Mutagenität der "Nitrobenzylalkohole" **122** und **123** selbst ist leicht verständlich. Durch die Aktivierung der Benzylposition steht bei diesen Verbindungen neben der Reaktion

über den Stickstoff (nach Bildung der Nitreniumionen) schließlich ein weiteres elektrophiles Reaktionszentrum zur Verfügung, das DNA-Addukte bilden kann. Da Hydroxydionen aber schlechte Abgangsgruppen sind, müssen diese in *Salmonella* durch Acetylierung vorher aktiviert werden. 4'BrCH₂-4NBp als Modellverbindung für einen solchen Ester zeigt, daß die Verbesserung der Abgangsgruppe in der Tat eine weitere Zunahme der Aktivität bewirkt. Interessanterweise ist nach einer Studie von Booth 4-Hydroxymethylbiphenyl ohne Nitrogruppe im Ames-Test nicht aktiv,²³² so daß offenbar nur bei gleichzeitiger Anwesenheit der elektronenziehenden Nitrogruppe Adduktbildung über die Benzylposition möglich ist. Die hohe Mutagenität von 4'HO₂C-4NBp ist dagegen eher auf den elektronenziehenden Effekt der Carboxylgruppe zurückzuführen, da diese selbst keine elektrophilen Eigenschaften hat. Durch Absenkung des LUMOs kann die Nitrogruppe einerseits leichter reduziert werden, andererseits werden das Hydroxylamin und dessen Ester stabilisiert und so ihre Lebensdauer und die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion mit der DNA erhöht. Die hohe Aktivität der Carboxylverbindung in beiden Teststämmen steht damit in gutem Einklang mit den QSAR-Vorhersagen, die sich aus den Analysen über den Einfluß elektronischer Faktoren aus Abschnitt D.3.3 ergeben.

F.5 Einfluß von Trifluormethylsubstituenten

Eine interessante Erweiterung zu den bisherigen Untersuchungen über Alkylgruppeneffekte ergab sich mit der Analyse des Einflusses von Trifluormethylgruppen auf die Mutagenität. Aufgrund der starken C-F-Bindung sind Trifluormethylreste metabolisch inaktiv und können nicht wie die Methylgruppen in Gegenwart von S9-Mix zur einer Aktivitätssteigerung beitragen. Über den Einfluß von CF₃-Gruppen auf die Mutagenität war bisher nichts bekannt.

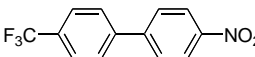
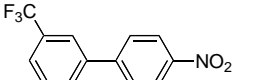
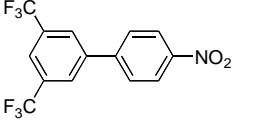
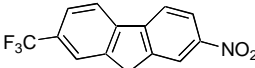
F.5.1 Ergebnisse und Diskussion

Da CF₃-Gruppen einen starken -I-Effekt haben, der sich auf die Aktivierung von Aminen und Nitroverbindungen möglicherweise unterschiedlich auswirken könnte, wurden je vier CF₃-substituierte Derivate aus beiden Substanzklassen untersucht. Die Nitroaromaten 4'CF₃-4NBp **126**, 3'CF₃-4NBp **127**, 3',5'DiCF₃-4NBp **128**, 7CF₃-2NF **129** wurden zur Testserie **5-I** und die Amine 4'CF₃-4ABp **130**, 3'CF₃-4ABp **131**, 3',5'DiCF₃-4ABp **132**, 7CF₃-2AF **13** zur Testserie **5-I** zusammengefaßt. Alle Substanzen wurden in DMSO bis zu einer maximalen Dosis von 2500 µg getestet (Tabelle 42).

Aus den Daten in Tabelle 42 ist ersichtlich, daß die CF₃-substituierten Nitrobiphenyle **126** - **128** in TA98 mit oder ohne S9-Mix alle inaktiv waren und auch bei den höchsten Konzentrationen keine cytotoxischen Reaktion hervorriefen. In TA100 stiegen die Induktionsfaktoren zwar etwas an, abgesehen von 4'CF₃-4NBp **126**, das in Gegenwart von S9-Mix ein schwach mutagenes Potential entwickelte, war dieser Anstieg jedoch dosisunabhängig. Die Revertanten erreichten bei keiner Dosierung das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes. Beim Nitrofluorenderivat **129** traten sehr unterschiedliche Ergebnisse auf, je nachdem, ob das Aktivierungssystem zugesetzt worden war oder nicht. Ohne S9-Mix erwies sich 7CF₃-2NF **129** als geringfügig mutagen und ergab Induktionsfaktoren bis maximal 2.4 in TA98-S9 und 2.6 in TA100-S9. In TA98-S9 bewirkten schwache cytotoxische Reaktionen bei Dosierungen von mehr als 50 µg allerdings wieder einen Rückgang der Revertantenzahlen. In Gegenwart von S9-Mix kam es dagegen zu einem auffälligen Anstieg der Aktivität, so daß schon in der niedrigsten Dosierung hohe Revertantenzahlen induziert wurden. Besonders ausgeprägt war die mutagene Reaktion in TA98+S9. Obwohl Mutagenitätssteigerungen durch S9-Zusatz bei Nitroaromaten nicht selten sind, war die Aktivitätszunahme beim 7CF₃-2NF **129** ungewöhnlich stark, besonders wenn man bedenkt, daß die CF₃-Gruppe selbst nicht aktiviert werden kann. Über die Ursache dieses Phänomens kann nur spekuliert werden: So könnte das Aktivierungssystem ähnlich wie beim unsubstituierten 2-Nitrofluoren 2NF **3** auch beim 7CF₃-2NF **129**

eine Ringhydroxylierung induzieren. Hydroxylierte 2-Nitrofluorene sind z.T. deutlich aktiver als ihre nicht hydroxylierten Analoga. Beim unsubstituierten 2NF **3** (Testserie **2-VI**) hatte der Zusatz von S9-Mix jedoch nur einen vergleichsweise schwachen Anstieg der Mutagenität bewirkt. Da die CF₃-Gruppe genau wie die Nitrofunktion Elektronen aus dem aromatischen System abzieht und somit im Vergleich zu 2NF **3** die Ringoxidation noch erschwert, ist die Ringhydroxylierung sicher nicht allein für die Mutagenitätszunahme verantwortlich.

Tabelle 42: Mutagenitätsdaten von CF₃-substituierten Nitroaromaten

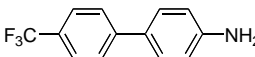
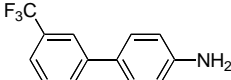
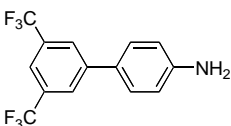
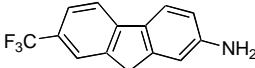
Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 5-I)					
		TA98		+S9		TA100	
		-S9				-S9	+S9
Positiv-Kontrolle ^a		2767		1890		916	1759
Negativ-Kontrolle	DMSO	36/33		44/38		168/134	177/114
 4'CF₃-4NBp 126	0	36	1.0	44	1.0	168	1.0
	10	36	1.0	43	1.0	205	1.2
	20	35	1.0	43	1.0	224	1.3
	100	39	1.1	43	1.0	259	1.5
	500	40	1.1	51	1.1	301	1.8
	2500 [*]	42	1.1	63	1.4	330	2.0
 3'CF₃-4NBp 127	0	36	1.0	44	1.0	168	1.0
	10	38	1.0	45	1.0	218	1.3
	20	35	1.0	46	1.0	226	1.3
	100	36	1.0	38	0.9	227	1.4
	500	35	1.0	39	0.9	231	1.4
	2500 [*]	37	1.0	41	0.9	221	1.3
 3',5'CF₃-4NBp 128	0	36	1.0	44	1.0	168	1.0
	10	36	1.0	40	0.9	218	1.3
	20	32	0.9	43	1.0	226	1.3
	100	41	1.1	44	1.0	227	1.4
	500	39	1.1	41	0.9	231	1.4
	2500 [*]	39	1.1	44	1.0	221	1.3
 7'CF₃-2NF 129	0	33	1.0	38	1.0	134	1.0
	5	67	2.0	333	8.8	236	1.8
	10	70	2.1	439	11.7	295	2.2
	20	80 ^b	2.4	633 ^b	16.8	316 ^b	2.4
	50	65	1.9	594	15.8	333	2.5
	100	64	1.9	773	20.5	344	2.6

* Ausfall. ^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

Relativ ähnliche Daten lieferte der Ames-Test mit den entsprechenden Aminen **130** - **133** (Testserie **5-II**, Tabelle 43). In Gegenwart des Aktivierungssystems zeigten 4'CF₃-4ABp **130** und 3'CF₃-4ABp **131** sehr geringe Mutagenität in TA98 und TA100 (jeweils geringer dosisabhängiger Anstieg), während 3',5'DiCF₃-4ABp **132** überhaupt nicht aktiv war. Im Gegensatz zu den entsprechenden Nitroverbindungen starben bei den höheren Dosierungen (500 µg, 2500 µg) alle Revertanten ab. Die höhere Cytotoxizität von Aminen im Vergleich zu Nitro-

verbindungen, auf die schon früher hingewiesen worden ist (siehe Abschnitt F.3.3), wurde also auch durch diese Daten bestätigt. In Testserie **5-II** traten hohe Induktionsfaktoren ebenfalls nur beim Fluorenderivat 7CF₃-2AF **133** auf, die genau wie beim Nitroanalogon in TA98 höhere Werte erreichten als in TA100. Die Aktivierung des Trifluormethyl-substituierten Amino- und Nitrofluorens führte also zu Metaboliten, die, wie ihre unsubstituierten Grundkörper auch, primär als Frameshift-Mutagene wirkten.

Tabelle 43: Mutagenitätsdaten von CF₃-substituierten Aminoaromaten

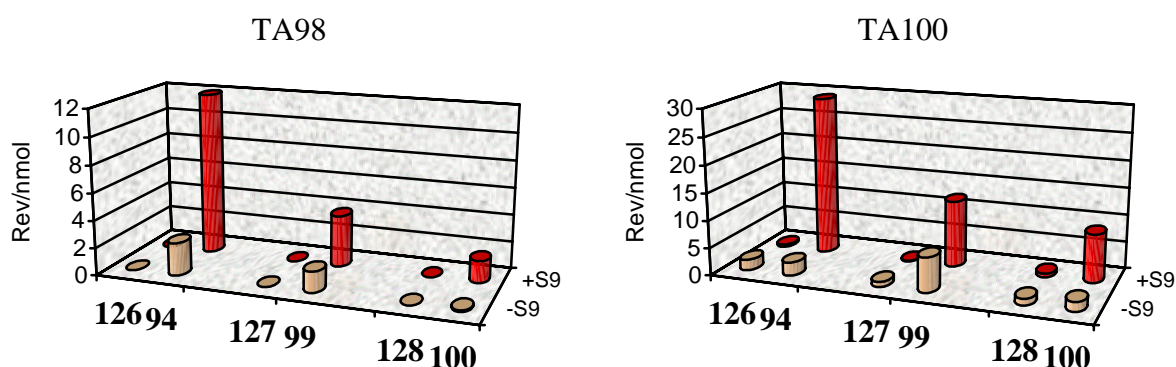
Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 5-II)			
		TA98 -S9	+S9	TA100 -S9	+S9
Positiv-Kontrolle ^a		1383	1005	813	1774
Negativ-Kontrolle ^b	DMSO	25/30	78/44	115/129	144/128
 4'CF₃-4ABp 130	0	25	78	115	144
	10	27	99	121	156
	20	29	102	116	166
	100	33	103 ^b	117	207
	500	34	95	120	200
	2500*	0	0	0	0
 3'CF₃-4ABp 131	0	25	78	115	144
	10	31	102	116	179
	20	36	113 ^b	119	229
	100	29	110	99	265
	500	0	36	26	0
	2500*	0	0	0	0
 3',5'CF₃-4ABp 132	0	25	78	115	144
	10	33	87	115	147
	20	29	89	123	141
	100	28	61 ^b	106	149
	500	28	59	27	69
	2500*	25	0	0	0
 7'CF₃-2AF 133	0	30	44	129	128
	5	32	112	111	196
	10	33	330	113	426
	20	33	665 ^b	130	965
	50	38	1166	123	1539 ^b
	100	40	1047	148	1495

* Ausfall. ^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

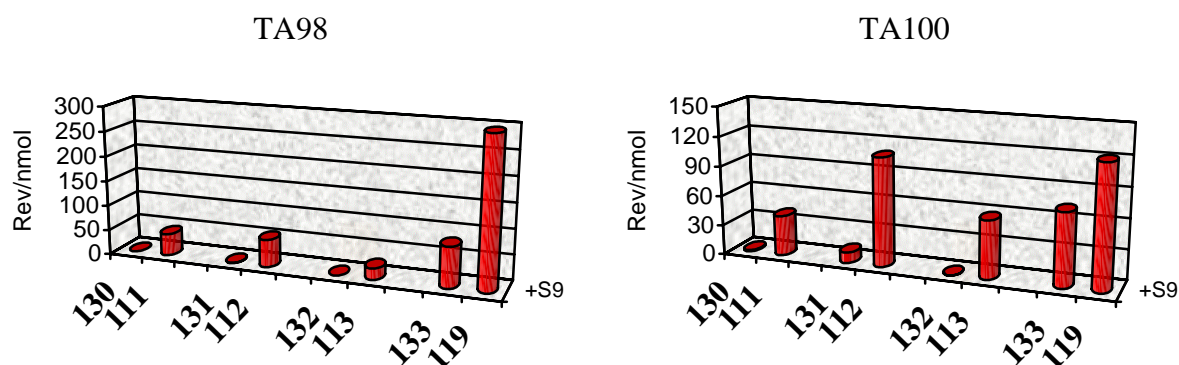
In Tabelle 44 und Tabelle 45 sind die mutagenen Potentiale in Revertanten/(10 nmol) für alle CF₃-substituierten Verbindungen zusammengefaßt und denen der entsprechenden Methylderivate aus den Testserien **2** und **3** gegenübergestellt. Deutlich ist zu erkennen, daß alle CF₃-Derivate eine geringere Aktivität als die jeweiligen Methylverbindungen zeigten. Die Aktivitätsunterschiede waren bei den Nitroaromaten in Gegenwart von S9-Mix etwas größer, da die Methylsubstituenten unter diesen Bedingungen noch zusätzlich aktiviert wurden.

Tabelle 44: Überblick über die Mutagenitäten CF_3 -substituierter Nitroaromaten

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4' CF_3 -4NBp	126	< 0.10	< 0.10	1.96	0.41
4'Me-4NBp	94	2.40	12.30	2.41	29.24
3' CF_3 -4NBp	127	< 0.10	< 0.10	0.91	0.12
3'Me-4NBp	99	1.52	3.80	6.32	12.23
3',5'Di CF_3 -4NBp	128	< 0.10	< 0.10	1.14	0.71
3',5'DiMe-4NBp	100	0.11	1.61	1.73	8.81
7' CF_3 -2NF	129	5.71	77.72	23.82	113.60
7Me-2NF	108	156.62	171.61	64.89	nicht bestimmbar

Abb. 100: Überblick über die Mutagenitäten CF_3 -substituierter 4-NitrobiphenyleTabelle 45: Überblick über die Mutagenitäten CF_3 -substituierter Aminoaromaten

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4' CF_3 -4ABp	130	-	0.35	-	1.40
4'Me-4ABp	111	-	43.85	-	40.56
3' CF_3 -4ABp	131	-	0.45	-	10.08
3'Me-4ABp	112	-	54.93	-	108.85
3',5'Di CF_3 -4ABp	132	-	< 0.10	-	0.15
3',5'DiMe-4ABp	113	-	22.59	-	58.00
7' CF_3 -2AF	133	-	80.76	-	72.83
7Me-2AF	119	-	295.16	-	121.71

Abb. 101: Überblick über die Mutagenitäten CF_3 -substituierter 4-Aminoaromaten

Interessanterweise zeigte das CF_3 -substituierte 2-Aminofluoren **133** in Gegenwart von S9-Mix eine ganz ähnliche Aktivität wie das 2-Nitrofluorenderivat **129**, auf dessen ungewöhnlich starke Abhängigkeit vom S9-Zusatz schon hingewiesen wurde. Möglicherweise ist dieser Effekt deshalb so ausgeprägt, weil die Nitrofunktion von $7CF_3$ -2NF **129** in Abwesenheit des S9-Mix unter der stark elektronenziehenden Wirkung des CF_3 -Substituenten durch cytosolische Reduktasen direkt zum Amin reduziert wird, das unter diesen Bedingungen keine Aktivität zeigen kann. Verstärkte Reoxidation in Gegenwart von S9-Mix könnte so die vergleichbar große Mutagenität wie beim $7CF_3$ -2AF **133** erklären.

F.6 Einfluß von *para*-Alkylsubstituenten bei Nitrostilbenen

Neben den Amino- und Nitroderivaten von Biphenyl und Fluoren gehören auch *trans*-4-Amino- und 4-Nitrostilbene zu den klassischen Modellkanzerogenen. Aufgrund der nicht aromatischen Doppelbindung ergeben sich bei der Aktivierung aber weitergehende Reaktionsmöglichkeiten, die – wie in Kapitel B.3 gezeigt – zu einer Reihe recht komplizierter DNA-Addukte führen können. Die Auswirkungen von Substituenten auf die Mutagenität von 4-Amino- und 4-Nitrostilbenen sind bereits von Sinsheimer²³⁵ und Hooberman²³⁶ untersucht worden, sterische Faktoren durch größere Reste als Methylsubstituenten wurden aber in diesen Studien nicht berücksichtigt.

F.6.1 Ergebnisse

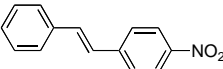
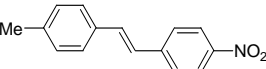
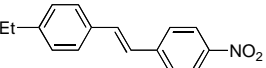
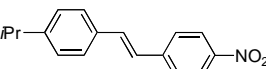
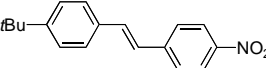
Es stellte sich daher die Frage, ob trotz der olefinischen Doppelbindung und der unterschiedlichen Adduktbildung sterisch anspruchsvolle Alkylreste weit weg von der funktionellen Gruppe dieselben Effekte wie bei den Biphenylen und Fluorenen bewirken würden. Zu diesem Zweck wurden außer dem Grundkörper 4-Nitrostilben (4NS **5**) Derivate mit einer Methyl- **134**, Ethyl- **135**, *iso*-Propyl **136**, *tert*-Butyl- **137** und *sec*-Butylgruppe **138** in DMSO im direkten Vergleich getestet (siehe Tabelle 46). Einige Proben enthielten geringe Anteile (bis zu 5 %) der *cis*-Isomeren, die durch Standard-Reinigungsmethoden (Umkristallisation, Flashchromatographie) nicht entfernt werden konnten. Da aus der Literatur bekannt war, daß *cis*-Nitrostilbene viel weniger mutagen sind als *trans*-Nitrostilbene,²³⁶ sollten diese Isomere nicht stören.ⁱ Um einen eventuellen Einfluß des *cis*-Anteils dennoch abschätzen zu können, wurde im Fall der *tert*-Butyl-Verbindung **137** zusätzlich zu der Probe mit einem Gehalt von ~ 5% *cis*-4*t*Bu-4NS **137a** eine Probe aus reinem *trans*-4*t*Bu-4NS (zur Reinigung siehe Abschnitt E.5) in die Testserie miteinbezogen (Probe **137**). Aufgrund der geringen Löslichkeit der Nitrostilbene, die erfahrungsgemäß zu einem Substanzausfall bei höheren Konzentrationen führt, erfolgte der Test hier in einem Dosisbereich bis maximal 100 µg.

Im Experiment zeigte der Grundkörper 4NS **5** – in guter Übereinstimmung mit Literaturergebnissen²³⁶ – in beiden Teststämmen deutliche Mutagenität und induzierte einen klaren Anstieg der Revertantenzahlen. In TA100-S9 traten bereits bei Dosierungen von 12.5 µg die typischen cytotoxischen Reaktionen auf. In Gegenwart von S9-Mix wurde die Aktivität (und die Cytotoxizität) jeweils reduziert, was nach Hooberman auf eine oxidative Detoxifikation

ⁱ *Cis*-Stilbene sind im Gegensatz zu den nahezu planaren *trans*-Stilbenen aufgrund der sterischen Abstoßung der Phenylringe viel stärker in sich verdreht. Dadurch wird die Konjugation zwischen den Phenylringen verringert, die Nitreniumionen können schlechter stabilisiert werden und die Mutagenität nimmt ab.

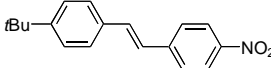
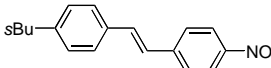
(z.B. Ringhydroxylierung) zurückzuführen sein könnte.²³⁶ Bei den Alkyl-substituierten Derivaten **134** - **137** ergaben sich recht unterschiedliche Effekte, je nachdem, ob die Verbindungen in Gegenwart oder in Abwesenheit von S9-Mix getestet wurden.

Tabelle 46: Mutagenitätsdaten von 4'-alkylierten 4-Nitrostilbenen

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 6-I)							
		TA98				TA100			
		-S9		+S9		-S9		+S9	
Positiv-Kontrolle ^a		2450		1661		1206		1830	
Negativ-Kontrolle	DMSO	36		47		176		130	
 4NS 5	0	36	1.0	47	1.0	176	1.0	130	1.0
	1.6	55	1.6	90	1.9	308	1.8	125	1.0
	3.1	76	2.1	92	2.0	460	2.6	124	1.0
	6.25	118	3.3	95	2.0	774	4.4	148	1.1
	12.5	162	4.5	105	2.2	625	3.5	195	1.5
	25	183	4.9	136	2.9	0	0.0	411	3.2
	50	209	5.0	225	4.8	0	0.0	773	6.0
 4'Me-4NS 134	0	36	1.0	47	1.0	176	1.0	130	1.0
	1.6	54	1.5	235	5.0	301	1.7	493	3.8
	3.1	59	1.7	267	5.7	359	2.0	631	4.9
	6.25	86	2.4	344	7.3	471	2.7	945	7.3
	12.5	101	2.8	585	12.5	491	2.8	1062	8.2
	25	105	2.9	774	16.5	522	3.0	0	0.0
	50	118	3.3	254	5.4	520	3.0	0	0.0
 4'Et-4NS 135 (5 % <i>cis</i>)	0	36	1.0	47	1.0	176	1.0	130	1.0
	1.6	-	-	435	9.3	-	-	433	3.3
	3.1	41	1.1	541	11.5	238	1.4	668	5.1
	6.25	59	1.6	681	14.5^b	298	1.7	1150	8.9
	12.5	58	1.6	981	20.9	299	1.7	619	4.8
	25	76	2.1	1069	22.7	312	1.8	0	0.0
	50	78	2.2	1145	24.4	315	1.8	0	0.0
 4'iPr-4NS 136 (4 % <i>cis</i>)	0	36	1.0	47	1.0	176	1.0	130	1.0
	1.6	-	-	94	2.0	-	-	191	1.5
	3.1	41	1.1	94	2.0	234	1.3	226	1.7
	6.25	40	1.1	111	2.4	245	1.4	358	2.8
	12.5	48	1.3	171	3.6	248	1.4	788	6.1
	25	46	1.3	259	5.5	249	1.4	1156	8.9
	50	41	1.1	536	11.4^b	249	1.4	375	2.9
 4'tBu-4NS 137	0	36	1.0	47	1.0	176	1.0	130	1.0
	1.6	-	-	124	2.6	-	-	394	3.0
	3.1	37	1.0	145	3.1	237	1.3	511	3.9
	6.25	41	1.1	188	4.0	267	1.5	857	6.6
	12.5	43	1.2	205	4.4	285	1.6	1022	7.9
	25	42	1.2	243	5.2	240	1.4	1125	8.7
	50	43	1.2	291	6.2	236	1.3	873	6.7
	100	48	1.3	-	-	236	1.3	-	-

^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

Tabelle 46: Mutagenitätsdaten von 4'-alkylierten 4-Nitrostilbenen - Fortsetzung

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 6-I)							
		TA98 -S9		+S9		TA100 -S9		+S9	
Positiv-Kontrolle ^a		2450		1661		1206		1830	
Negativ-Kontrolle	DMSO	36		47		176		130	
 4'-tBu-4NS 137a (5 % <i>cis</i>)	0	36	1.0	47	1.0	176	1.0	130	1.0
	1.6	-	-	135	2.9	-	-	365	2.8
	3.1	36	1.0	140	3.0	183	1.0	589	4.5
	6.25	41	1.1	160	3.4	213	1.2	795	6.1
	12.5	36	1.0	212	4.5	273	1.5	909	7.0
	25	40	1.1	246	5.2	270	1.5	923	7.1
	50	44	1.2	298	6.3	260	1.5	973	7.2
	100	52	1.5	-	-	259	1.5	-	-
 4'-sBu-4NS 138 (5% <i>cis</i>)	0	36	1.0	47	1.0	176	1.0	130	1.0
	1.6	-	-	74	1.6	-	-	170	1.3
	3.1	37	1.0	74	1.6	226	1.3	208	1.6
	6.25	37	1.0	119	2.5	230	1.3	264	2.0
	12.5	42	1.2	126	2.7	233	1.3	389	3.0
	25	53	1.5	196	4.2^b	254	1.4	686 ^b	5.3
	50	76	2.1	246	5.2	275	1.6	897	6.9
	100	90	2.5	-	-	253	1.4	-	-

^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

In Abwesenheit des Aktivierungsmixes belegten die experimentellen Daten in TA98-S9 und TA100-S9 eine kontinuierliche Abnahme der Mutagenität mit der Größe der Alkylsubstituenten. So war 4'-Me-4NS **134** nur etwa halb so aktiv wie der Grundkörper **5**, und auch beim Übergang zu 4'-Et-4NS **135** und weiter zu 4'-iPr-4NS **136** verringerte sich die Mutagenität in TA100-S9 jeweils auf die Hälfte, in TA98-S9 sogar noch etwas mehr. 4'-iPr-4NS **136** und 4'-tBu-4NS **137** waren in TA98-S9 völlig inaktiv und in TA100-S9 nur schwach mutagen, erreichten aber auch hier bei keiner Konzentration das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes. Die sehr ähnliche Aktivität der beiden Proben von 4'-tBu-4NS **137** und **137a** bewies zudem, daß geringe Anteile vom *cis*-Isomer die Aussagekraft des Ames-Tests nicht signifikant beeinflussen. Das Derivat 4'-sBu-4NS **138** mit der etwas weniger sperrigen *sec*-Butylgruppe induzierte in TA98-S9 im Vergleich zu **137** wieder etwas höhere Revertanzahlen, in TA100-S9 war es aber genauso schwach aktiv wie 4'-iPr-4NS **136** oder 4'-tBu-4NS **137**. In Abwesenheit von S9-Mix ergab sich somit im Prinzip derselbe Effekt wie bei den *para*-alkylierten Nitrobiphenylen und Nitrofluorenen. Sterische Effekte reduzieren also auch bei Nitrostilbenen die Mutagenität. Ähnlich wie bei den anderen Systemen könnte

die Aktivitätsverminderung auf die Veränderung der konformativen Gleichgewichte zurückzuführen sein.ⁱ

Im Kontrast zu diesem Ergebnis wurde durch den Zusatz von S9-Mix die Aktivität aller Alkylderivate enorm gesteigert und sterische Effekte rückten in den Hintergrund. Die zusätzliche Methylgruppe in **134** bewirkte unter diesen Bedingungen im Vergleich zum Grundkörper **5** in beiden Stämmen ungefähr eine Verzehnfachung der Mutagenität.ⁱⁱ Die Ethylverbindung 4'Et-4NS **135** induzierte sogar noch höhere Revertantenzahlen pro nmol (TA98: Faktor 25, TA100: Faktor 13). In TA98+S9 führte der Austausch gegen die größeren Alkylresten zwar wieder zu einer Abnahme der Mutagenität, dennoch blieben 4'*i*Pr-4NS **136**, 4'*t*Bu-4NS **137** oder 4'*s*Bu-4NS **138** jeweils aktiver als das unsubstituierte 4NS **5**. In TA100+S9 ergab sich im Hinblick auf die Beziehung zwischen Mutagenität und sterischem Anspruch schließlich überhaupt kein einheitliches Bild mehr. 4'Me-4NS **134**, 4'Et-4NS **135** und 4'*t*Bu-4NS **137** erwiesen sich sämtlich als extrem mutagen und induzierten mindestens zehnfach höhere Revertantenzahlen als der Grundkörper **5**. 4'*i*Pr-4NS **136** und 4'*s*Bu-4NS **138** waren zwar insgesamt weniger aktiv, aber auch sie übertrafen genau wie in TA98+S9 die Aktivität des Grundkörpers deutlich. Der *cis*-Anteil von **137** in Gegenwart von S9-Mix hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Mutagenität, so daß die Revertantenzahlen der beiden Proben von 4'*t*Bu-4NS **137** quasi identisch sind.

Die mutagenen Potentiale in Revertanten/(10 nmol) sind in Tabelle 47 zusammengestellt.

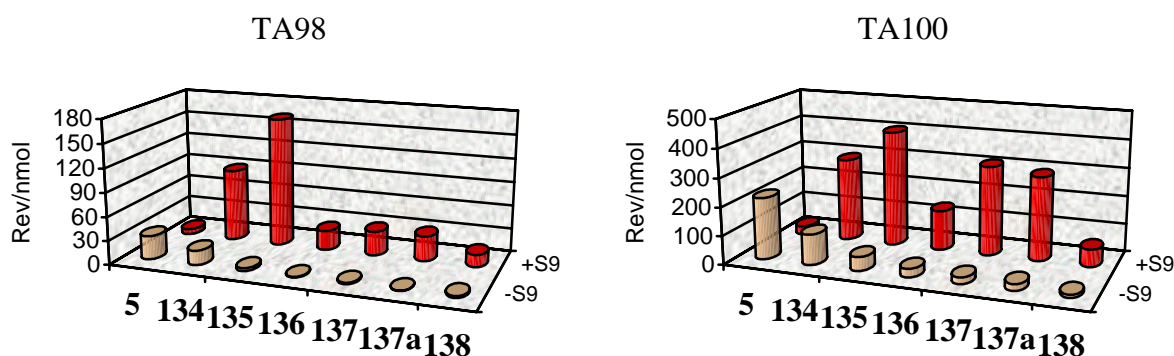
Tabelle 47: Überblick über die Mutagenitäten 4'-alkylierter 4-Nitrostilbene

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4NS	5	29.70	6.80	217.06	30.13
4'Me-4NS	134	18.33	91.51	107.77	295.21
4'Et-4NS (5% <i>cis</i>)	135	3.83	163.42	49.45	408.11
4' <i>i</i> Pr-4NS (4% <i>cis</i>)	136	1.03	24.81	29.51	141.12
4' <i>t</i> Bu-4NS (0% <i>cis</i>)	137	1.67	30.62	22.87	315.52
4' <i>t</i> Bu-4NS (5% <i>cis</i>)	137a	0.43	31.63	22.87	295.23
4' <i>s</i> Bu-4NS (5% <i>cis</i>)	138	2.33	15.51	10.73	61.62

ⁱ Bisher ist allerdings nicht bekannt, ob konformative Heterogenität auch bei DNA mit Amino-/Nitrostilbenaddukten auftritt.

ⁱⁱ Ein vergleichbarer Effekt war auch von Hooberman beobachtet worden.²³⁶

Abb. 102: Überblick über die Mutagenitäten 4'-alkylierter 4-Nitrostilbene



F.6.2 Diskussion

Während die Abnahme des mutagenen Potentials von **5** → **137/138** in Abwesenheit von S9-Mix die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen bestätigte, stellte der Mutagenitätsverlauf bei **5** - **138** in Gegenwart von S9-Mix einen bemerkenswerten Sonderfall dar. Obwohl man in Gegenwart von S9-Mix Mutagenitätssteigerungen durch kleine Alkylreste auch bei den anderen Grundkörpern beobachtet hatte, war die aktivierende Wirkung bei den Amino-/Nitro-biphenylen und -fluorenen durch den sterischen Effekt der großen Alkylsubstituenten jeweils überkompensiert worden. Bei den Nitrostilbenen tritt dieses Phänomen offensichtlich nicht auf. In TA98+S9 war ein sterischer Effekt zwar immer noch erkennbar, reichte aber nicht aus, die gleichzeitig stattfindende Aktivierung zu übertreffen. Im Stamm TA100+S9, der sowieso weniger empfindlich als TA98 auf sterische Effekte reagiert, wurde der sterische Effekt – der in der ersten Meßreihe ohne S9-Mix noch sehr deutlich war – durch die Aktivierung nun vollständig überdeckt und spielte überhaupt keine Rolle mehr. In TA100+S9 führten daher alle Alkylsubstituenten zu einer Erhöhung der Mutagenität.

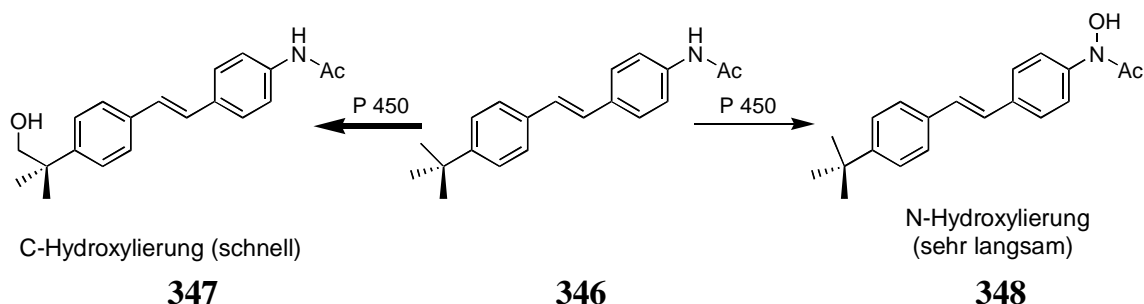
Mittlerweile sind in unserem Arbeitskreis auch die entsprechenden 4'-Alkyl-4-aminostilbene im Ames-Test untersucht worden.²⁷³ Hier ergab sich in Gegenwart von S9-Mix ebenfalls eine ausgeprägte Zunahme des mutagenen Potentials durch Einführung von Methyl-, Ethyl- und *iso*-Propylsubstituenten. Die *tert*-Butyl-Verbindung und – in geringerem Ausmaß – die *sec*-Butyl-Verbindung zeigten im Gegensatz zu den Nitroverbindungen aber wieder in beiden Teststämmen einen sterischen Effekt und waren deutlich weniger aktiv.

Wie der enorme Anstieg der Mutagenität in Gegenwart von S9-Mix belegt, ermöglichen die Alkylsubstituenten im Vergleich zum Grundkörper eine zusätzliche oxidative Aktivierung, durch die der normalerweise mutagenitätsreduzierende Einfluß der sterisch anspruchsvollen Gruppen weitgehend verloren geht oder überdeckt wird. Prinzipiell wäre es denkbar, daß die

158

Tatsächlich war in der Arbeit von Hanna im Fall von 4'-*tert*-Butyl-N-acetyl-4-aminostilben **346** die konkurrierende aliphatische Oxidation erstaunlicherweise noch ausgeprägter als bei der Methylverbindung **343**. Die Metabolisierung ergab fast ausschließlich den primären Alkohol **347** (Abb. 104).²⁷²

Abb. 104: C-Hydroxylierung versus N-Hydroxylierung bei **346**



Unter den Bedingungen des Ames-Test könnte weiterer oxidativer Abbau unter Spaltung der C-C-Bindung dann zur Entstehung von Benzylkationen führen, die mit der DNA Addukte bilden. Gerade bei den Nitrostilbenen ist ein vergleichbarer Angriff auf die Alkylreste sogar noch wahrscheinlicher, da die oxidative Aktivierung des Stickstoffs als Konkurrenzreaktion im Vergleich zu den Amido- oder den wesentlich leichter N-oxidierbaren Aminostilbenen völlig wegfällt. Wenn die Aktivierung aber mit einem teilweisen Abbau der Alkylreste einhergeht, würden auch sterische Effekte reduziert.

F.7 Einfluß von *para*-Alkoxy-/Hydroxysubstituenten und Derivaten

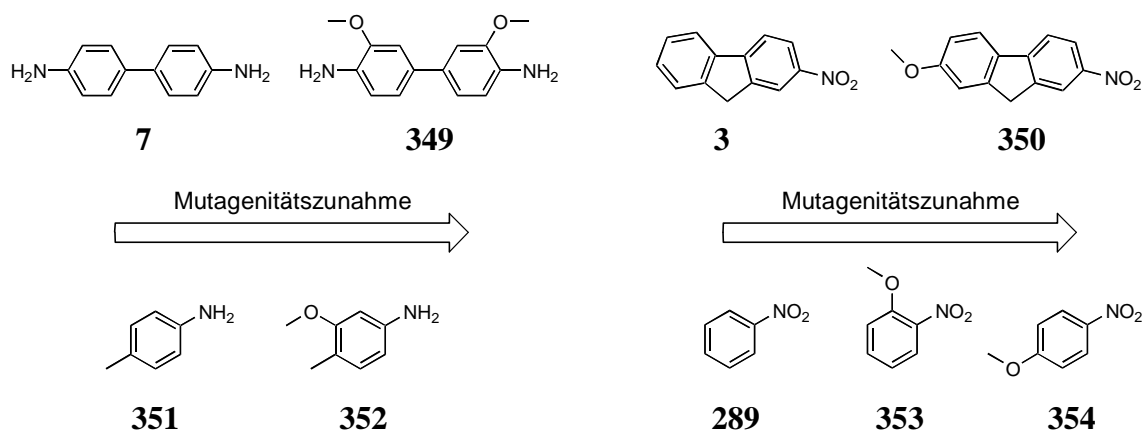
F.7.1 Literaturüberblick

Eine wichtige Untergruppe der Klasse der Amino-/Nitroaromaten bilden die Verbindungen, die Sauerstoffsubstituenten tragen. So gehört die Einführung von Hydroxysubstituenten durch Ringoxidation zu den Metabolisierungsreaktionen, die typischerweise neben der Aktivierung der Amino-/Nitrogruppe ablaufen (siehe B.2). Auch bei der Inkubation von Nitrobiphenyl mit S9-Mix ist die Bildung von ringhydroxyliertem Nitrobiphenyl (mutmaßlich 4'-OH-4NBp) massenspektroskopisch beobachtet worden.³⁷ Unklar ist, ob diese Reaktion zur einer Erhöhung (Toxifizierung) oder Verringerung (Detoxifizierung) der Aktivität führt.

Amino-/Nitroaromaten mit Alkoxysubstituenten finden breite Verwendung in Labor und Industrie. Beispielsweise haben sie in der Farbstoffherstellung große Bedeutung, da man durch Einführung von Alkoxygruppen (+M-Substituenten) die Farbe von Azoverbindungen beeinflussen kann. Außerdem verbessern sie häufig die Löslichkeit der Farbstoffe. Die Synthese von 4'-Methoxy-4-nitrobiphenyl ist eine typische Testreaktion bei der Untersuchung von Übergangsmetall-katalysierten Kreuzkupplungen, die seit einigen Jahren intensiv erforscht werden.¹⁵⁴ 4-Amino-/Nitrobiphenyle mit Alkoxysubstituenten dienen zudem als Ausgangsstoffe zur Herstellung flüssigkristalliner Materialien.¹⁶¹ Das mutagene/kanzerogene Potential solcher Verbindungen ist bisher weitgehend unerforscht und ihre Verwendung daher potentiell bedenklich.

In der Tat ergab eine Auswertung der wenigen publizierten Beispiele, daß gerade die Gegenwart von Methoxysubstituenten die Mutagenität von Amino-/Nitroaromaten stark erhöhen kann.

Abb. 105: Einfluß von Methoxysubstituenten



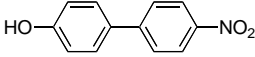
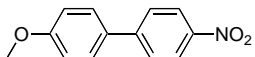
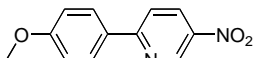
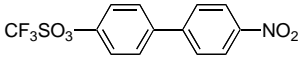
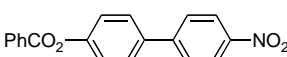
So ist beispielsweise 3,3'-Dimethoxybenzidin **349** in TA98+S9 nach einer Studie von Sinsheimer um ein Vielfaches stärker mutagen als Benzidin **7**,²³⁴ *ortho*- und *para*-Nitroanisole **353** und **354** wurden im Gegensatz zu Nitrobenzol **289** positiv getestet,¹⁹⁷ und 3-Methoxy-4-methylanilin **352** ist mutagen, während 4-Methylanilin **351** inaktiv ist. Auch 7-Methoxy-2-nitrofluoren **350** war im Ames-Test deutlich aktiver als 2-Nitrofluoren **3**.¹⁹⁵ Eine Ausnahme dieses Trends war nur bei substituierten Amino-/Nitrostilbenen festzustellen, bei denen Methoxysubstituenten eher zu einer Abnahme der Mutagenität im Vergleich zu den Grundkörpern führten.^{235,236} Über die Mutagenität von 4'-Methoxy-4-amino/-4-nitrobiphenyl war bisher nichts bekannt.

F.7.2 Ergebnisse

Zur Klärung des genotoxischen Potentials dieser Verbindungen wurde in einer weiteren Testreihe (Testserie **7-I**) untersucht, wie sich 4'-HO-4NBp **139**, 4'-MeO-4NBp **140** und sein heteroaromatisches Analogon 4'-MeO-2Ph5NP **143** im Ames-Test verhalten. Zusätzlich wurden das Triflat (4'-CF₃SO₂O-4NBp **141**) und der Benzoesäureester (PhCOO-4NBp **142**) von 4'-HO-4NBp **139** miteinbezogen, die sich aber elektronisch, sterisch und im Hinblick auf die Hydrophobie stark von **139** und **140** unterscheiden. Alle Substanzen wurden in DMSO getestet (Tabelle 48). Das mutagene Potential von **139** - **143** in Revertanten/(10 nmol) ist in Tabelle 49 aufgeführt. Zum Vergleich wurden hier auch die Daten der unsubstituierten Grundkörper 4NBp **1** und 5Ph2NP **106** aufgenommen.

4'-HO-4NBp **139** erwies sich in beiden Stämmen als aktiv. In TA98±S9 war die Mutagenität von **139** allerdings nur schwach ausgeprägt, so daß bei der höchsten Testkonzentration (100 µg) gerade das Doppelte des Lösungsmittelkontrollwertes erreicht wurde. Im Vergleich zum unsubstituierten 4NBp **1** bewirkte der Hydroxysubstituent in TA98 eine Reduktion der Mutagenität unabhängig davon, ob man in Gegenwart oder in Abwesenheit von S9-Mix arbeitete. In TA100 wurden Induktionsfaktoren von ~ 2 schon bei Konzentrationen von 25 µg (-S9) bzw. 12.5 µg (+S9) beobachtet. In diesem Stamm war 4'-HO-4NBp **139** stärker aktiv als 4NBp **1**. Die Ringhydroxylierung des Nitroaromaten führte in TA100 also nicht wie in TA98 zu einer Detoxifikation, sondern zu einer Toxifikation. Die in Abschnitt F.3.2 beobachtete Zunahme der Mutagenität von 4NBp **1** in TA100 in Gegenwart von S9-Mix könnte also mit der Bildung von 4'-HO-4NBp **139** erklärt werden.

Tabelle 48: Mutagenität von Hydroxy-/Alkoxysubstituierten Nitroaromaten und Derivaten

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 7-I)							
		TA98				TA100			
		-S9		+S9		-S9		+S9	
Positiv-Kontrolle ^a		2701		1210		842		1463	
Negativ-Kontrolle	DMSO	54/31/39/47		80/48/61		90/118/123/99		99/106/136	
 4'HO-4NBp 139	0	54	1.0	80	1.0	90	1.0	99	1.0
	6.25	66	1.2	120	1.5	112	1.2	136	1.4
	12.5	68	1.3	121	1.5	138	1.5	193	1.9
	25	76	1.4	124	1.6	174	1.9	304	3.1
	50	90 ^b	1.7	147	1.8	278	3.1	614	6.2
	100	98	1.8	169	2.1	540	6.0	1175	11.9
 4'MeO-4NBp 140	0	31	1.0	48	1.0	118	1.0	106	1.0
	5	683	22.3	65	1.4	761	6.4	188	1.8
	10	1061	34.6	99	2.1	1170	9.9	308	2.9
	20	1469 ^b	47.9	268	5.6	1680 ^b	14.2	940 ^b	8.8
	50	1938	63.2	1338 ^b	27.9	1228	10.4	600	5.6
	100	1840	60.0	723	15.1	32	0.3	6	0.1
	500	1231	40.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0
 4'MeO-2Ph5NP 143	0	39	1.0	61	1.0	123	1.0	136	1.0
	5	700	17.9	385	6.3	598	4.9	531	3.9
	10	1593	40.8	1102	18.1	1047	8.5	1019	7.5
	20	2017	51.7	1744	28.6	1760	14.4	253	1.9
	50	2931	75.1	1326	21.7	2107	17.2	72	0.5
	100	2059	52.8	430	7.0	203	1.7	86	0.6
 4'CF ₃ SO ₃ -4NBp 141	0	47	1.0	80	1.0	99	1.0	99	1.0
	6.25	54	1.1	92	1.2	94	1.0	102	1.0
	12.5	36	0.8	95	1.2	95	1.0	109	1.1
	25	36	0.8	94	1.2	99	1.0	107	1.1
	50	38	0.8	95	1.2	103	1.0	107	1.1
	100	38	0.8	92	1.2	106	1.1	113	1.1
	500	49	1.0	94	1.2	120	1.2	120	1.2
 4'PhCOO-4NBp 142	0	47	1.0	80	1.0	99	1.0	99	1.0
	6.25	54	1.1	112	1.4	81	0.8	119	1.2
	12.5	44	0.9	115	1.4	91	0.9	130	1.3
	25	40	0.9	120	1.5	108	1.1	147	1.5
	50	39	0.8	121	1.5	100	1.0	146	1.5
	100	40	0.9	123	1.5	94	1.0	146	1.5
	500	41	0.9	125	1.6	90	0.9	148	1.5

^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

Besonders hohe Mutagenitätswerte traten bei 4'MeO-4NBp **140** auf, das in TA98 um den Faktor 50 (-S9) bzw. 13 (+S9) und in TA100 um den Faktor 26 (-S9) bzw. 9 (+S9) aktiver als 4NBp **1** war. In TA98-S9 wurde bereits bei einer Dosis von 5 µg ein Induktionsfaktor von 22.3 gemessen. Sowohl im Vergleich zum Grundkörper 4NBp **1** als auch im Vergleich zu **139** mit der freien Hydroxygruppe bewirkte die Methoxyfunktion – in Analogie zu den oben erwähnten Beobachtungen bei anderen Nitroaromaten – eine enorme Steigerung der Mutagenität. In Gegenwart von S9-Mix war die Mutagenitätszunahme allerdings in beiden Stämmen (vor allem in TA98) deutlich geringer. Aufgrund cytotoxischer Effekte starben bei höheren

Dosierungen alle Revertanten ab. Die aktivitätssteigernde Wirkung von Methoxysubstituenten wurde auch durch die experimentellen Daten von 4'MeO-5Ph2NP **143** eindrucksvoll unterstrichen. Genau wie 4'MeO-4NBp **140** erwies sich 4'MeO-5Ph2NP **143** als extrem aktiv in beiden Stämmen. Im Vergleich zum Grundkörper 5Ph2NP **106** war der Effekt der Methoxygruppe bei **143** sogar noch ausgeprägter als bei den carbocyclischen Analoga. Durch den S9-Mix wurde die Mutagenität von **143** in TA98+S9 deutlich reduziert, nicht jedoch in TA100+S9.

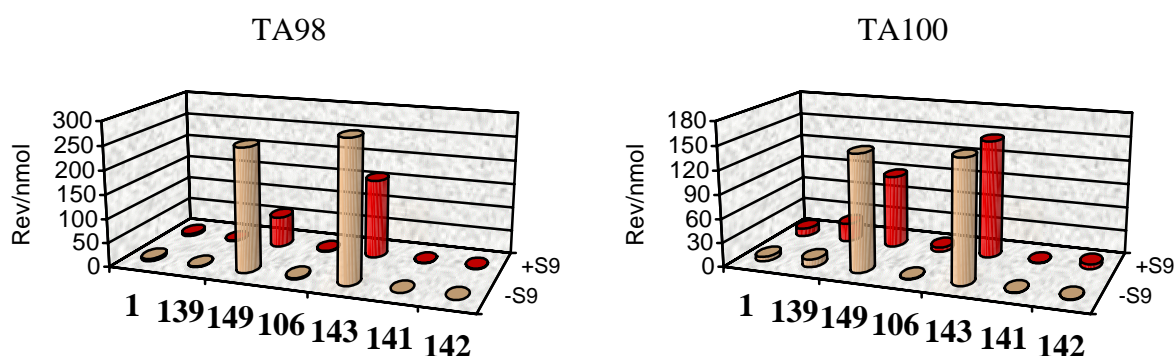
Tabelle 49: Überblick über die Mutagenitäten RO-substituierter Nitroaromaten

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4NBp ^a	1	5.14	5.07	5.60	10.19
4'HO-4NBp	139	1.41	1.39	9.65	23.66
4'MeO-4NBp ^a	140	256.71	64.49	146.38	92.21
5Ph2NP	106	3.02	2.17	0.74	5.65
4'MeO-5Ph2NP ^a	143	291.77	164.08	152.03	148.00
4'CF ₃ SO ₃ -4NBp	141	< 0.10	0.43	0.37	0.37
4'PhCOO-4NBp	142	< 0.10	1.16 ^b	0.74	5.88

^a Skaliert auf dieselben Spontanrevertantenzahlen: TA98-S9 50; TA98+S9 50; TA100-S9 100; TA100+S9 100.

^b Schlechte Linearität.

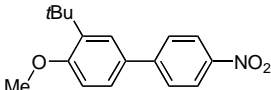
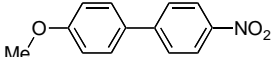
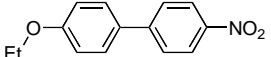
Abb. 106: Überblick über die Mutagenitäten RO-substituierter Nitroaromaten



Die Veresterung der Hydroxygruppe mit der sperrigen Trifluormethansulfonsäure (4'CF₃SO₃-4NBp **141**) oder mit Benzoesäure (4'PhCOO-4NBp **142**) hatte dagegen in beiden Stämmen einen Rückgang der Aktivität zur Folge. Das Triflat war in keinem Fall aktiv, und der Benzoesäureester zeigte nur in Gegenwart von S9-Mix eine sehr schwache dosisabhängige Zunahme der Revertantenzahlen. Diese wird möglicherweise durch die Spaltung des Esters verursacht (Bildung des mutagenen 4'HO-4NBp **139**).

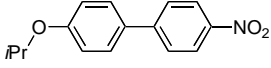
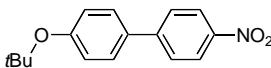
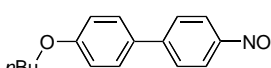
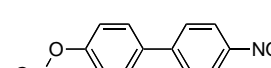
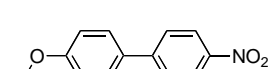
Anhand verschiedener Amino-/Nitroaromaten (Biphenyle, Azabiphenyle, Fluorene, Stilbene) ist in dieser Arbeit bisher gezeigt worden, daß Molekülmodifikationen, durch die die Planarität insgesamt verloren geht (Einführung raumfüllender Alkylsubstituenten), geeignet sind, die Mutagenität wirksam zu reduzieren. Die ausgesprochen hohe Aktivität von 4'-MeO-4NBp **140** bot nun die Möglichkeit durch Gerüstmodifikation mit einer sperrigen *tert*-Butylgruppe das Potential dieses Effekts an einem weiteren Beispiel, nämlich 3'*t*Bu4'MeO-4NBp **144**, zu verifizieren. Außerdem erhob sich die Frage, in wie weit Alkylgruppen nicht nur am Ring, sondern auch gebunden an Sauerstoff sterisch wirksam sein können. Zu diesem Zweck wurden 4'-MeO-4NBp **140** (nur TA98±S9) und die davon abgeleiteten Ether mit einem Ethyl-, *iso*-Propyl-, *tert*-Butyl-, *n*-Butyl-, *n*-Octyl- **149** oder Adamantylrest **150** in einer Vergleichsserie (Tabelle 50, Testserie 7-II) untersucht. Um eine möglichst exakte Auswertung auch bei hoch mutagenen Stoffen zu gewährleisten, wurden nur Konzentrationen aus dem linearen Dosisbereich getestet.

Tabelle 50: Mutagenität von Alkoxy-substituierten 4-Nitrobiphenylen

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 7-II)							
		TA98 -S9				TA100 -S9			
Positiv-Kontrolle ^a		2701		1210		842		1463	
Negativ-Kontrolle ^b	DMSO	54/47/28		80/38		90/99		99	
 3'<i>t</i>Bu4'MeO-4NBp 144	0	54	1.0	80	1.0	90	1.0	99	1.0
	6.25	54	1.0	85	1.1	95	1.1	101	1.0
	12.5	39	0.7	79	1.0	99	1.1	104	1.1
	25	36	0.7	83	1.0	117	1.3	120	1.2
	50	35	0.7	86	1.1	124	1.4	114	1.2
	100	40	0.7	89	1.1	130	1.4	108	1.1
 4'MeO-4NBp 140	0	28	1.0	38	1.0	-	-	-	-
	5	622	22.2	162	4.3	-	-	-	-
	10	971	34.7	424	11.2	-	-	-	-
	20	1401	50.0	1180	31.1	-	-	-	-
	50	2176	77.7	1789	47.1	-	-	-	-
	100	0	0.0	0	0.0	-	-	-	-
 4'EtO-4NBp^c 145	0	47	1.0	80	1.0	99	1.0	99	1.0
	0.8	79	1.7	83	1.0	135	1.4	117	1.2
	1.6	131	2.8	93	1.2	126	1.3	132	1.3
	3.1	201	4.3	193	2.4	193	1.9	246	2.5
	6.25	442	9.4	396	5.0	333	3.4	486	4.9
	12.5	595	12.6	791	9.9	566	5.7	739	7.5
	25	665	14.1	988	12.4	881	8.9	1145	11.5
	50	726	15.4	1108	13.9	951	9.6	1312	13.3
	100	885	18.8	1227	15.3	1002	10.1	1263	12.8

^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde. ^c Mittelwerte aus verschiedenen Testserien.

Tabelle 50: Mutagenität von Alkoxy-substituierten 4-Nitrobiphenylen- Fortsetzung

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 7-II)							
		TA98				TA100			
		-S9		+S9		-S9		+S9	
Positiv-Kontrolle ^a		2701		1210		842		1463	
Negativ-Kontrolle ^b	DMSO	54/47/28		80/38		90/99		99	
 4'iPrO-4NBp 146	0	54	1.0	80	1.0	90	1.0	99	1.0
	6.25	53	1.0	85	1.1	162	1.8	164	1.7
	12.5	69	1.3	110	1.4	206	2.3	267	2.7
	25	93	1.7	126	1.6	317	3.5	386	3.9
	50	107	2.0	150	1.9	478	5.3	512	5.2
	100	150	2.8	170	2.1	715	7.9	878	8.9
 4'tBuO-4NBp 147	0	54	1.0	80	1.1	90	1.0	99	1.0
	6.25	58	1.1	89	1.1	147	1.6	173	1.7
	12.5	59	1.1	105	1.3	183	2.0	243	2.5
	25	49	0.9	95	1.2	256	2.8	310	3.1
	50	56	1.0	94	1.2	312	3.5	367	3.7
	100	57	1.1	88	1.1	353	3.9	413	4.2
 4'nBuO-4NBp 148	0	54	1.0	80	1.0	90	1.0	99	1.0
	6.25	75	1.4	110	1.4	157	1.7	147	1.5
	12.5	79	1.5	113	1.4	212	2.4	210	2.1
	25	82	1.5	116 ^b	1.5	215	2.4	243	2.5
	50	93	1.7	118	1.5	227	2.6	233	2.4
	100	105	2.0	125	1.6	232	2.7	244	2.5
 4'nOctO-4NBp 149	0	54	1.0	80	1.0	90	1.0	99	1.0
	6.25	62	1.1	86	1.1	80	0.9	90	0.9
	12.5	45	0.8	84	1.1	93	1.0	94	1.0
	25	45	0.8	79	1.0	102	1.1	97	1.0
	50	45	0.8	80	1.0	101	1.1	98	1.0
	100	46	0.9	98	1.2	100	1.1	100	1.0
 4'AdO-4NBp 150	0	54	1.0	80	1.0	90	1.0	99	1.0
	6.25	56	1.0	90	1.1	101	1.1	88	0.9
	12.5	48	0.9	87	1.1	102	1.1	96	1.0
	25	46	0.9	84	1.1	104	1.2	95	1.0
	50	45	0.8	83	1.0	105	1.2	92	0.9
	100	54	1.0	87	1.0	132	1.5	110	1.1

^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde. ^c Mittelwerte aus verschiedenen Testserien.

Tatsächlich bewirkte die Einführung der sperrigen *tert*-Butylgruppe in 3'*t*Bu4'MeO-4NBp **144** im Vergleich zu 4'MeO-4NBp **140** einen enormen Rückgang der Mutagenität und bestätigte damit die Effizienz von sterischen Effekten zur Mutagenitätskontrolle. In beiden Stämmen war 3'*t*Bu-4'MeO-4NBp **144** in Gegenwart und in Abwesenheit des S9-Mix im Prinzip inaktiv. So wurde in TA98±S9 überhaupt keine Zunahme der Revertantenzahlen gemessen (in TA98-S9 traten statt dessen schwache cytotoxische Reaktionen auf), und in TA100±S9 kam es nur zu einem sehr geringen Anstieg der Revertanten.

4'MeO-4NBp **140** zeigte dagegen wie in der vorangegangenen Meßreihe wieder extrem hohe Mutagenität. Sehr ähnliche Ergebnisse ergaben sich für das Ethylderivat 4'EtO-4NBp **145**, das

aufgrund seiner Aktivität in beiden Stämmen auch bei besonders niedrigen Dosierungen untersucht wurde. Eine Verdoppelung der Revertantenzahlen trat in TA98-S9 bereits bei einer Dosierung von 1.6 μg und in TA100 (\pm S9) bei einer Dosierung von 3.1 μg auf. Der Austausch des Ethylrestes gegen einen *iso*-Propylrest in **146** führte dagegen zu einer klaren Abnahme der Mutagenität, so daß Revertantenzahlen über dem Doppelten des Lösungsmittelkontrollwertes erst bei Dosierungen von 50 μg (TA98), bzw. 12.5 μg (TA100) erreicht wurden. Parallel wurden auch die cytotoxischen Reaktionen stark zurückgedrängt. Diese Trends setzten sich bei den nachfolgenden Verbindungen kontinuierlich fort: 4'*t*BuO-4NBp **147** und 4'*n*BuO-4NBp **148** waren beide weniger mutagen als 4'*i*PrO-4NBp **146**, während 4'*n*OctO-4NBp **149** sowie 4'AdO-4NBp **150** in TA98 \pm S9 und TA100 \pm S9 gar keine Aktivität mehr zeigten.

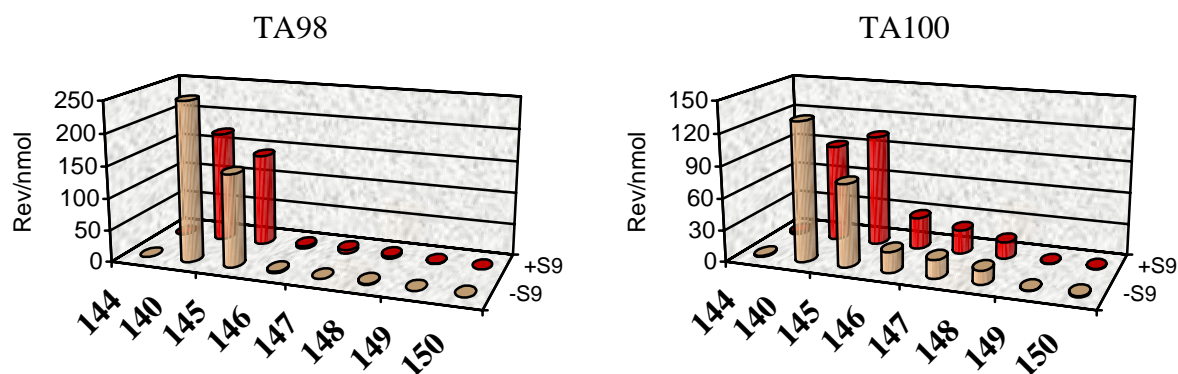
Tabelle 51: Überblick über die Mutagenitäten Alkoxy-substituierter Nitroaromaten

Verbindung ^a	Revertanten/(10 nmol)			
	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
3' <i>t</i> Bu-4'MeO-4NBp 144	< 0.10	0.24	1.13	2.45
4'MeO-4NBp 140	253.25	174.16	131.74	92.21
4'EtO-4NBp 145	145.64	144.85	78.33 ^b	105.51 ^b
4' <i>i</i> PrO-4NBp 146	2.50	3.66	19.63	30.06
4' <i>t</i> BuO-4NBp 147	< 0.10	5.43	17.56	22.59
4' <i>n</i> BuO-4NBp 148	1.69	3.31	12.97	15.66
4' <i>n</i> OctO-4NBp 149	< 0.10	0.46	0.46	0.18
4'AdO-4NBp 150	< 0.10	< 0.10	1.23	0.49

^a Skaliert auf dieselben Spontanrevertantenzahlen: TA98-S9 47; TA98+S9 80; TA100-S9 90; TA100+S9 99.

^b Daten aus letzter Messung.

Abb. 107: Überblick über die Mutagenitäten Alkoxy-substituierter Nitroaromaten

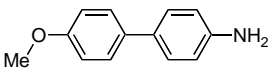
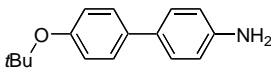


Insgesamt reagierte, wie schon in anderen Meßreihen festgestellt worden war, der Frameshift-Stamm TA98 wieder empfindlicher auf die sterischen Veränderungen als der Basensubstitu-

tionsstamm TA100. Besonders die Verbindungen 4'*i*PrO-4NBp **146**, 4'*t*BuO-4NBp **147** und 4'*n*BuO-4NBp **148** induzierten in TA98±S9 eine deutlich geringere Revertanzzunahme als in TA100±S9. Auffällig war weiterhin, daß das mutagene Potential bei 4'EtO-4NBp **145**, 4'*i*PrO-4NBp **146** und 4'*t*BuO-4NBp **147** durch S9-Mix in TA100 erhöht wurde.

Da alle bisherigen Ergebnisse gezeigt haben, daß sich sterische Effekte bei Nitroaromaten und aromatischen Aminen gleich auswirken, wurde der Einfluß von Alkoxysubstituenten auf die Mutagenität von Aminen nur an zwei ausgewählten Substanzen – nämlich 4'MeO-4ABp **151** und 4'*t*BuO-4ABp **152** – überprüft (Testserie 7-III).

Tabelle 52: Mutagenität von Alkoxy-substituierten 4-Aminobiphenylen

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 7-III)					
		TA98 -S9	+S9	TA100 -S9	+S9		
Positiv-Kontrolle ^a		1487	1167	898	1612		
Negativ-Kontrolle ^b	DMSO	31	48	118	106		
 4'MeO-4ABp 151	0	31	1.0	48	1.0	118	1.0
	5	58	1.9	237	4.9	110	0.9
	10	59	1.9	497	10.4	113	1.0
	20	74	2.4	1030	21.5	122	1.0
	50	91	3.0	2062 ^b	43.0	126	1.1
	100	137	4.5	2580	53.8	134	1.1
	500	239	7.8	2304	48.0	169	1.4
 4' <i>t</i> BuO-4ABp 152	0	31	1.0	48	1.0	118	1.0
	5	30	1.0	45	0.9	112	1.0
	10	33	1.1	49	1.0	105	0.9
	20	34	1.1	41	1.1	103	0.9
	50	31	1.0	71	1.5	113	1.0
	100	31	1.0	82 ^b	1.7	114	1.0
	500	31	1.0	113	2.3	107	0.9

^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

Wie erwartet, ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den entsprechenden Nitroaromaten. 4'MeO-4ABp **151** erwies sich als sehr stark mutagen in beiden Stämmen. Das Derivat mit der raumfüllenden *tert*-Butoxygruppe 4'*t*BuO-4ABp **152** zeigte dagegen eine wesentlich geringere Aktivität.

Tabelle 53: Überblick über die Mutagenitäten RO-substituierter Aminoaromaten

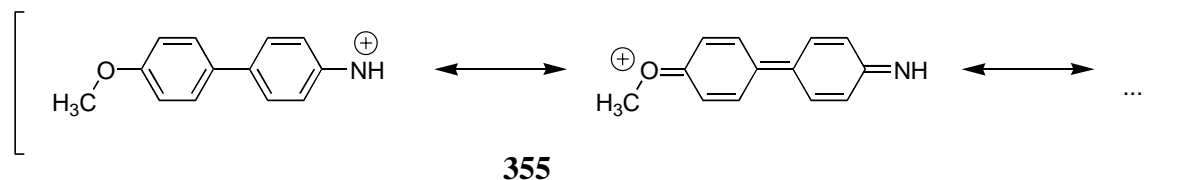
Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4'MeO-4ABp	151	-	80.70	-	35.06
4' <i>t</i> BuO-4ABp	152	-	0.96	-	7.76

Fazit: Die Einführung von Methoxy- und Ethoxysubstituenten bewirkt bei Amino- und Nitroaromaten eine starke Erhöhung der Mutagenität. Durch den Austausch dieser Gruppen gegen Alkoxy substituenten mit sterisch anspruchsvollen (Adamantyl, *tert*-Butyl) oder sehr langen Alkylresten (*n*-Octyl) kann die Aktivität dieser Verbindungen sehr stark vermindert oder sogar völlig ausgelöscht werden.

F.7.3 Diskussion

Für die starke Mutagenitätserhöhung durch Methoxysubstituenten gibt es in der Literatur bisher keine befriedigende Erklärung. Nach den Analysen von Debnath und Hansch (siehe Abschnitt D.4) sollten gerade Substituenten mit einem +M-Effekt bei Nitroverbindungen eher zu einer Abnahme der Mutagenität führen, da sie die LUMOs anheben und somit die Reduktion der Nitrogruppe erschweren. Tatsächlich wurden aber 4-Nitrobiphenyl und 4-Aminobiphenyl durch den zusätzlichen Methoxysubstituenten gleich stark aktiviert. Wichtiger scheint hier deshalb dessen stabilisierende Wirkung auf die intermediär auftretenden Nitreniumionen **355** zu sein, die durch Resonanzeffekte zu einer Erhöhung der Lebensdauer führt.

Abb. 108: Stabilisierung von Nitreniumionen durch Methoxysubstituenten

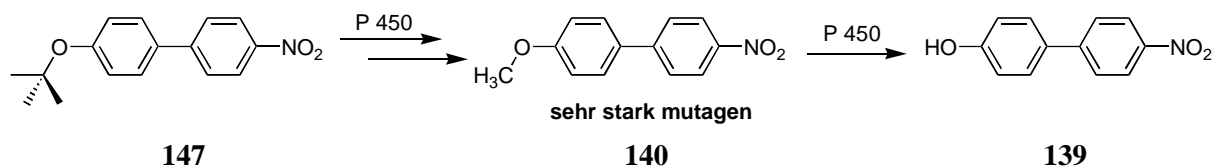


Eindeutig ist dagegen der sterische Einfluß der Alkylsubstituenten, der wieder zu einer Verringerung der Mutagenität führt. Dieser Effekt ist offensichtlich unabhängig davon, ob die Alkylgruppe direkt an den aromatischen Ring wie bei 3'*t*Bu-4'MeO-4NBp **144** oder an den Sauerstoff gebunden ist. Auch die geringe Aktivität des Triflats (4'CF₃SO₃-4NBp **141**) und des Benzoessäureesters (4'PhCOO-4NBp **142**) aus Testserie **7-I** können als sterische Effekte gedeutet werden. Verantwortlich für den sterischen Effekt sind vermutlich dieselben Phänomene, die bei den Alkyl-substituierten Verbindungen diskutiert worden sind (siehe Abschnitte F.3.4 und F.3.5).

Die Wirkung des metabolischen Aktivierungssystems bei Nitroaromaten kann ebenfalls zwanglos erklärt werden. So ist in Abschnitt F.1 erwähnt worden, daß an Heteroatome wie Sauerstoff gebundene Alkylgruppen in Gegenwart von S9-Mix schrittweise oxidativ abgebaut werden.¹⁹⁹ Einzelne Methylgruppen werden dabei unter Katalyse von CYP 450 durch Elek-

tronen- und Sauerstofftransfer oxidiert und abgespalten.ⁱ Auf diese Weise wird der sterische Effekt von Ethyl-, *iso*-Propyl- und *tert*-Butylgruppen reduziert und die Mutagenität nimmt zu.

Abb. 109: Oxidativer Abbau von Alkoxygruppen durch S9-Mix



Da ein solcher oxidativer Abbau mit zunehmender Größe der Alkylgruppen aber immer langsamer wird, ist die Mutagenitätszunahme vergleichsweise gering und spielt bei 4'*n*OctO-4NBp **149** und 4'AdO-4NBp **150** keine Rolle mehr. Analog ist die starke Aktivitätsabnahme bei 4'MeO-4NBp **140** in Gegenwart des S9-Mix darauf zurückzuführen, daß durch oxidative Demethylierung aus **140** das wesentlich weniger mutagene 4'HO-4NBp **139** entsteht. Vergleichbare Reaktionen sollten auch bei den Aminen 4'MeO-4ABp **151** und 4'*t*BuO-4ABp **152** auftreten.

ⁱ In der Regel erfolgt die Abspaltung als Formaldehyd.

F.8 *Einfluß von Amino-/N,N-Dialkylaminosubstituenten*

F.8.1 Literaturüberblick

In Abschnitt D.5 wurde erwähnt, daß die Mutagenität unter anderem von der Anzahl der Amino- oder Nitrogruppen abhängig ist. Bei der gleichzeitigen Anwesenheit von Amino- und Nitrogruppen im selben Molekül sind die Verhältnisse noch komplizierter, da die Metabolisierung einer Gruppe jeweils durch die andere beeinflußt werden kann. Aufgrund ihrer industriellen Anwendung ist die Mutagenität von Aromaten mit gleichzeitig vorhandenen Amino- und Nitrogruppen bereits für die einige gängige Grundkörper (Benzol, Biphenyl, Fluoren, Stilben) untersucht worden. Hier sollen nur solche Fälle betrachtet werden, bei denen die Amino- und Nitrogruppe in Konjugation zueinander stehen. Grundsätzlich bergen die meisten dieser Verbindungen eine hohes mutagenes/kanzerogenes Potential.

Besonders wichtig im Hinblick auf die Mutagenität im Ames-Test ist die Frage, ob der Test in Gegenwart oder in Abwesenheit von S9-Mix durchgeführt wird, da ohne S9 nur die Nitrogruppe aktiviert werden kann, mit S9 dagegen beide Gruppen. Tatsächlich zeigen die publizierten Daten je nach Bedingungen signifikante Unterschiede. Nitrobenzol als einfachster Vertreter der aromatischen Nitroverbindungen ist – wie bereits erwähnt – in keinem *Salmonella*-Stamm positiv, 4-Nitroanilin zeigt dagegen schwache Mutagenität in TA98 und TA100 mit metabolischer Aktivierung, bleibt jedoch ohne S9 inaktiv.¹⁹⁶ Nohara hat gezeigt, daß die Mutagenität von 4-Nitrobiphenyl durch die Einführung einer Aminogruppe in 4'-Position in TA98+S9 deutlich verstärkt wird (Faktor 7), in TA98-S9 dagegen kaum. In TA100 bewirkt dieselbe Aminofunktion statt dessen eine starke (-S9), bzw. schwache (+S9) Abnahme der Mutagenität.⁷⁹ Vergleichbare Effekte wurden auch bei Aminonitrostilbenen beobachtet. So ist 4'-Amino-4-nitrostilben in TA98+S9 um den Faktor 14 aktiver als unsubstituiertes 4-Nitrostilben, während die Mutagenität in TA98-S9 etwas sinkt. In TA100 reduziert die Aminogruppe die Mutagenität dagegen etwas (+S9), und ohne S9 ist 4'-Amino-4-nitrostilben in TA100 sogar inaktiv. Vom Fluorengrundkörper sind nur Daten von TA1538 und TA98 bekannt. Auch 2-Amino-7-nitrofluoren ist in Gegenwart von S9-Mix in diesen beiden Stämmen viel aktiver (TA98: Faktor 25!) und ohne S9-Mix etwas weniger mutagen als unsubstituiertes 2-Nitrofluoren.

Als übereinstimmendes Ergebnis aller dieser Tests bleibt festzuhalten, daß eine Aminogruppe das mutagene Potential von Nitroaromaten in Abwesenheit von S9-Mix kaum ändert bzw. tendenziell eher senkt (besonders in TA100), daß sie aber in Gegenwart von S9, wenn die

Aminogruppe selbst auch aktiviert werden kann, in TA98+S9 eine starke Aktivitätssteigerung bewirkt, während die Mutagenität in TA100+S9 vergleichsweise wenig verändert wird.

F.8.2 Ergebnisse

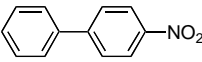
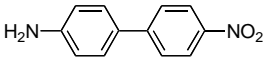
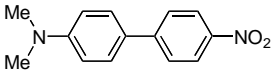
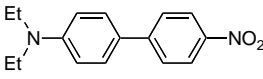
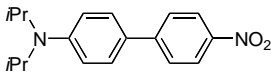
Aminogruppen können durch Alkylsubstitution leicht modifiziert werden, ohne ihre elektromenschiebenden Eigenschaften zu verlieren. Gleichzeitig erhöhen solche Alkylgruppen ihren sterischen Anspruch. Nach den bisher gewonnen Erkenntnissen sollten Modifikationen dieser Art ausreichen, um das mutagene Potential von Aminonitroaromaten wirkungsvoll zu reduzieren. Da an Stickstoff gebundene Alkylreste jedoch ähnlich wie Alkoxy substituenten oxidativ abgebaut werden können, war unklar, ob auch in Gegenwart von S9-Mix die Mutagenität wirklich abnimmt. Die Untersuchungen aus Testserie **1-I** hatten ja gezeigt, daß Methylgruppen beispielsweise sehr schnell oxidativ abgespalten werden. 4'-NH₂-4NBp **153** und entsprechende N,N-Dialkylderivate (4'-NMe₂-4NBp **154**, 4'-NEt₂-4NBp **155** und 4'-NiPr₂-4NBp **156**) wurden daher im Ames-Test untersucht (Testserie **8-I**). Die geringe Löslichkeit dieser Verbindungen in DMSO und THF erlaubte maximale Testkonzentrationen von 500 µg (Tabelle 54).

4'-NH₂-4NBp **153** erwies sich in beiden *Salmonella* Stämmen als eindeutig mutagen, induzierte in TA98 aber insgesamt höhere Revertantenzahlen als in TA100 und muß daher primär als Frameshift-Mutagen angesehen werden. In Gegenwart des S9-Mixes wurde das mutagene Potential in beiden Stämmen noch deutlich erhöht, was im wesentlichen auf die zusätzliche Aktivierung der Aminogruppe zurückzuführen sein dürfte. Im Vergleich zu 4NBp **1** zeigte 4'-NH₂-4NBp **153** nur in TA98+S9 signifikant höhere Mutagenität (Faktor 4), während es in TA100-S9 weniger mutagen und in TA100+S9 ungefähr genauso mutagen war. Diese Daten stehen damit im guten Übereinstimmung zu den weiter oben erwähnten Ergebnissen von No-hara.⁷⁹

Auch bei den N,N-Dialkylaminoverbindungen **154** - **156** ergaben sich große Unterschiede, je nachdem, ob S9-Mix zugesetzt worden war oder nicht. Ohne S9-Zusatz induzierte keine dieser Verbindungen erhöhte Revertantenzahlen. Durch die Einführung von Dialkylaminosubstituenten wurde die Mutagenität des Grundkörpers unter diesen Bedingungen also generell verringert. Die Anwesenheit des Aktivierungssystems führte dagegen z.T. zu sehr klaren mutagenen Reaktionen. Hohe Induktionsfaktoren traten in TA98+S9 mit 4'-NMe₂-4NBp **154** und 4'-NEt₂-4NBp **155** schon bei niedrigen Dosierungen auf, stiegen aber mit steigender Konzentration nicht weiter an, was auf cytotoxisches Verhalten hindeutet. Im Kontrast dazu war

4'*Ni*Pr₂-4NBp **156** mit seinen beiden sterisch anspruchsvollen *iso*-Propylsubstituenten auch in Gegenwart von S9 in TA98 nur ein sehr schwaches Mutagen und blieb in TA100 sogar völlig inaktiv.

Tabelle 54: Mutagenität von *N,N*-Dialkyl-4'-amino-/4'-Amino-4-nitrobiphenylen

Verbindung	Dosis (µg/Platte)	Revertanten, Induktionsfaktoren (Testserie 8-I)							
		TA98				TA100			
		-S9		+S9		-S9		+S9	
Positiv-Kontrolle ^a		3102		1965		1023		2499	
Negativ-Kontrolle ^b	DMSO	47		80		99		99	
 4NBp 1	0	47	1.0	80	1.0	99	1.0	99	1.0
	20	116	2.5	156	2.0	166	1.7	233	2.4
	100	239 ^b	5.1	485 ^b	6.1	380 ^b	3.8	615 ^b	6.2
 4'H ₂ N-4NBp 153	0	47	1.0	80	1.0	99	1.0	99	1.0
	6.25	101	2.1	176	2.2	119	1.2	143	1.5
	12.5	113	2.4	328	4.1	114	1.2	167	1.7
	25	158	3.3	451 ^b	5.7	123	1.2	244 ^b	2.5
	50	217 ^b	4.6	530	6.7	158 ^b	1.6	301	3.0
	100	256	5.4	842	10.6	167	1.7	397	4.0
 4'Me ₂ N-4NBp 154	0	47	1.0	80	1.0	99	1.0	99	1.0
	6.25	49	1.0	334	4.2	88	0.9	127	1.3
	12.5	47	1.0	339 ^b	4.3	99	1.0	146 ^b	1.5
	25	42	0.9	381	4.8	105	1.1	138	1.4
	50	41	0.9	383	4.8	105	1.1	144	1.5
	100	44 ^b	0.9	411	5.2	108 ^b	1.1	152	1.5
 4'Et ₂ N-4NBp 155	0	47	1.0	80	1.0	99	1.0	99	1.0
	6.25	48	1.0	315	4.0	103	1.0	122	1.2
	12.5	41	0.9	322	4.0	95	1.0	137 ^b	1.4
	25	42	0.9	331 ^b	4.2	103	1.0	125	1.3
	50	41	0.9	354	4.4	103	1.0	131	1.3
	100	48	1.0	361	4.5	101	1.0	126	1.3
	500	52 ^b	1.0	444	5.6	127 ^b	1.3	123	1.3
 4' <i>i</i> Pr ₂ N-4NBp 156	0	47	1.0	80	1.0	99	1.0	99	1.0
	6.25	47	1.0	103	1.3	88	0.9	100	1.0
	12.5	45	0.9	103	1.3	92	0.9	95	1.0
	25	43	0.9	108	1.4	90	0.9	99	1.0
	50	42	0.9	120 ^b	1.5	100	1.0	96	1.0
	100	42 ^b	0.9	124	1.6	101	1.0	85	0.9
	500	38	0.8	89	1.1	113 ^b	1.1	105 ^b	1.0

^a TA98-S9 1-Nitropyren 2.5 µg; TA100-S9 Natriumazid 5 µg; TA98+S9 und TA100+S9 2-Aminoanthracen 2.5 µg. ^b Markiert die höchste Dosis, die in die Regressionsanalyse miteinbezogen wurde.

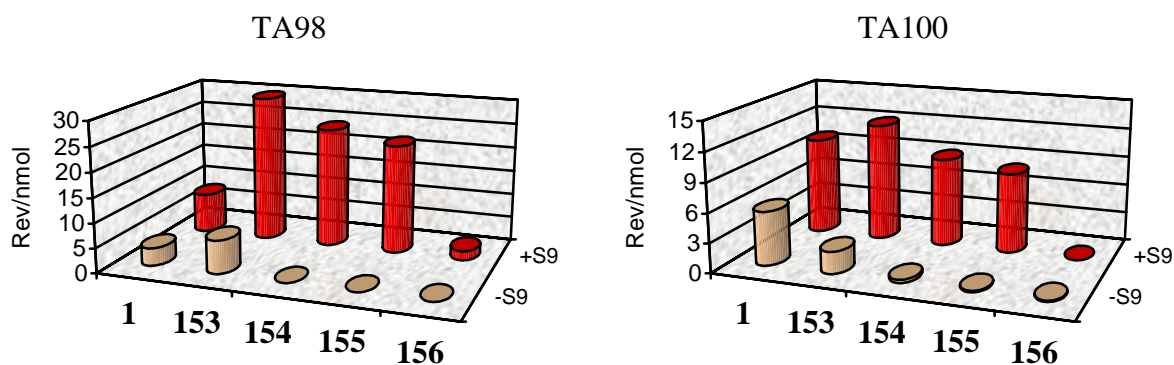
Die entsprechenden Mutagenitätsangaben in Revertanten/(10 nmol) sind in Tabelle 55 aufgeführt und mit denen des Grundkörpers 4NBp **1** verglichen.

Tabelle 55: Überblick über die Mutagenitäten NH_2 -/ NR_2 -substituierter Nitroaromaten

Verbindung		Revertanten/(10 nmol)			
		TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
4NBp	1	3.61	8.10	5.52	10.06
4'NH ₂ -4NBp	153	6.76	32.31	2.27	12.15
4'NMe ₂ -4NBp	154	< 0.10	24.43 ^a	0.33	9.11 ^a
4'NEt ₂ -4NBp	155	< 0.10	22.20 ^a	0.15	8.22 ^a
4'N ⁱ Pr ₂ -4NBp	156	< 0.10	1.90	0.12	< 0.10

^a schlechte Linearität

Abb. 110: Überblick über die Mutagenitäten Alkylamino-substituierter Nitroaromaten



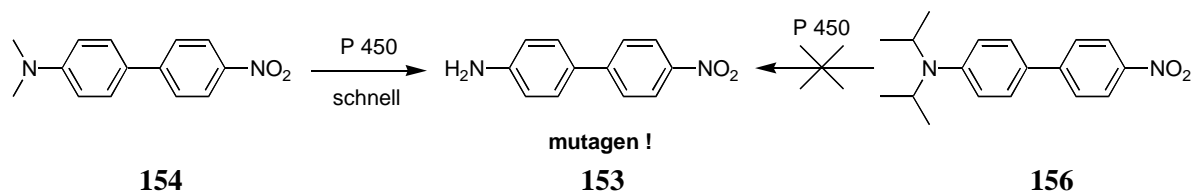
Fazit: Mutagene Aminonitroaromaten können durch Alkylierung der Aminogruppe mit sperrigen *iso*-Propylresten in nicht mutagene Derivate überführt werden.

F.8.3 Diskussion

Im Lichte der bereits diskutierten Ergebnisse deuten auch die in dieser Testserie gewonnenen Mutagenitätsdaten der alkylierten 4'Amino-4-nitrobiphenyle **154** - **156** wieder auf einen sterischen Effekt hin. Die Reduktion der Mutagenität durch Alkylierung der Aminofunktion ist vor allem in Abwesenheit des S9-Mixes in beiden Teststämmen deutlich. Tatsächlich weist nach dem Taft-Modell (D.3.3) schon eine N,N-Dimethylaminogruppe einen ähnlichen E_s -Wert wie eine *iso*-Propylgruppe auf. Nach den Ergebnissen aus Abschnitt F.3.2 (Tabelle 33) führt eine *iso*-Propylgruppe ebenfalls zur Auslöschung der Mutagenität. Der E_s -Wert einer unsubstituierten Aminogruppe (-0.61) ist dagegen kleiner als der eines Methylrests (-1.24). In Gegenwart des metabolischen Aktivierungssystems wurde dieser Effekt zumindest bei 4'NMe₂-4NBp **154** und 4'NEt₂-4NBp **155** allerdings fast völlig eliminiert, so daß sich **154** und **155** unter diesen Bedingungen ähnlich mutagen wie 4'NH₂-4NBp **153** verhielten. Verständlich wird dieses Phänomen, wenn man bedenkt, daß stickstoffgebundene Methyl- oder Ethyl-

gruppen durch CYP 450-Katalyse rasch oxidativ abgebaut werden können. Beim sperrigeren Di-*iso*-propylderivat sollten entsprechende Dealkylierungen wesentlich langsamer erfolgen, so daß der sterische Effekt hier weiterhin voll wirksam bleibt.

Abb. 111: Reduktion des sterisches Effekts durch Dealkylierung



G QSAR-Analyse

G.1 Vergleich von vorhergesagten und experimentellen Mutagenitäten

Wie in Kapitel D ausgeführt, wird das mutagene Potential von aromatischen Aminen und Nitroaromaten in den *Salmonella* Stämmen TA98 und TA100 hauptsächlich durch die Hydrophobie (log P), die Anzahl der kondensierten Ringe (nur bei TA98) und durch elektronische Faktoren (z.B. Orbitalenergien) bestimmt. Diese Schlußfolgerung ergibt sich übereinstimmend aus allen bekannten QSAR-Untersuchungen. Sterische Faktoren spielen in diesen Untersuchungen keine Rolle – auch nicht in den sehr umfangreichen Analysen von Debnath und Hansch. So betonen die Autoren in ihrer Arbeit über mutagene Verbindungen in TA98 "... *we were unable to find any typical steric factors ...*".¹⁰⁶ Bei einer genaueren Betrachtung ihrer Daten fällt allerdings auf, daß trotz der großen strukturellen Vielfalt der Amino- und Nitroaromaten im wesentlichen nur Variationen des aromatischen Ringsystems abgedeckt wurden. Substituenteneffekte, besonders solche von sterisch anspruchsvollen Resten, wurden dagegen kaum erfaßt. Sich dieser Limitierung sehr wohl bewußt, räumen die Autoren daher ein, "... *that it is important to investigate the hydrophobic effect of aliphatic side chains on the mutagenicity to see if it parallels that of the flat aromatic system*".

Die im letzten Kapitel beschriebenen Mutagenitätsuntersuchungen an den *ortho*- und *para*-alkylierten Amino- und Nitroaromaten füllen genau diese Lücke. Die Verringerung der Mutagenität mit zunehmender Größe der Alkylreste läßt vermuten, daß es sich dabei im wesentlichen um ein sterisches Phänomen handelt. Da Alkylgruppen außer sterischen Veränderungen aber auch die Orbitalenergien und vor allem die Hydrophobie beeinflussen, war unklar, inwieweit solche Effekte durch die QSAR-Gleichungen bereits erfaßt werden. Ähneln die Effekte der Alkylreste denen des aromatischen Grundgerüsts vielleicht doch so sehr, daß die Berücksichtigung von Hydrophobie und elektronischen Faktoren allein völlig ausreicht? Oder sind die bestehenden Gleichungen ungeeignet, diese Effekte richtig wiederzugeben? Können die QSAR-Korrelationen durch Einbeziehung sterischer Faktoren gegebenenfalls sogar verbessert werden? Ein umfassender Vergleich zwischen experimentellen und vorhergesagten Mutagenitäten sollte diese Fragen beantworten.

Zur Vorhersage der Mutagenität wurden die Studien von Debnath und Hansch herangezogen. Sie haben als einzige Korrelationsgleichungen sowohl für aromatische Amine in Gegenwart von S9-Mix (Gleichung (8) und (9)) als auch für Nitroaromaten (Gleichung (10) und (11)) in Abwesenheit von S9-Mix für beide *Salmonella*-Stämme entwickelt (siehe Abschnitt D.4). Als

Strukturparameter wurden log P-Werte und Orbitalenergien (E_{HOMO} , E_{LUMO}) benötigt. Zu diesem Zweck wurden die Geometrien der Verbindungen aus den Testserien **2-I – 2-VI**, **3-I – 3-III**, **5-I**, **5-II** und **6-I** durch eine Kombination von Kraftfeldrechnungen (MM2) und semiempirischen Methoden (AM1) optimiert und anschließend die Orbitalenergien nach dem AM1-Verfahren ermittelt (siehe I.1.1). Die Berechnung der log P-Werte erfolgte mit dem Programm KOWWIN. Dieses liefert zwar nicht exakt dieselben Werte wie das CLOGP-Programm, das von Debnath und Hansch verwendet wurde, ein Vergleich der KOWWIN Werte mit publizierten CLOGP Werten zeigte aber, daß die Abweichungen nur sehr gering (± 0.2 Einheiten) und die Vorhersagetrends völlig identisch sind.ⁱ Die experimentellen Mutagenitätsdaten wurden von Revertanten/(10 nmol) in log (Revertanten/nmol) umgerechnet.

G.1.1 *Ortho*-alkylierte Verbindungen

In Tabelle 56 (Aminoaromaten)^{206,151} und Tabelle 57 (Nitroaromaten)²⁰⁷ sind die log P-Werte, die Orbitalenergien, die vorhergesagten sowie die experimentellen Mutagenitäten der *ortho*-alkylierten Verbindungen zusammengefaßt. Für einige Grundkörper standen Mutagenitätsdaten aus mehreren Tests zur Verfügung, so daß hier Mittelwerte verwendet wurden. Zudem wurde das mutagene Potential für die 2-Aminofluorene in TA98 (Schmitt)²⁰⁶ auf die üblicherweise gemessenen Werte skaliert (vgl. F.2.1.2), um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit mit den Daten, die auch Debnath und Hansch zur Entwicklung ihrer Gleichungen benutzt haben, zu gewährleisten.

Tabelle 56 zeigt, daß die berechneten log P-Werte ausgehend von den Grundkörpern (2-Aminonaphthalin 2AN **6**, 2-Aminofluoren 2AF **4**, 4-Aminobiphenyl 4ABp **2**) erwartungsgemäß mit der Anzahl und der Größe der Alkylreste kontinuierlich zunahmen (**6** → **311**, **4** → **315**, **4** → **322**). Dabei erhöhte ein linearer Alkylrest wie *n*-Butyl die Hydrophobie etwas stärker als ein verzweigter Rest wie *tert*-Butyl. Zwei kleine Alkylreste bewirkten eine höhere Hydrophobie als ein längerer mit der selben Anzahl C-Atome (zweimal Methyl > Ethyl; zweimal Ethyl > *n*-Butyl). Diese Berechnungen stimmen mit experimentellen Beobachtungen gut überein.^{106,104}

Aufgrund ihres +I-Effektes sollten Alkylreste grundsätzlich zu einer Anhebung der Orbitalenergien führen. Eine solche Anhebung wurde auch beobachtet, wobei die HOMOs immer etwas stärker betroffen waren als die LUMOs. 2*t*Bu-2AN **211** stellt die einzige Ausnahme dar

ⁱ Nach einer Studie der Firma ACD, bei der unter anderem die von KOWWIN und CLOG berechneten log P-Werte mit experimentellen Hydrophobiewerten verglichen wurden, sind die Ergebnisse des KOWWIN-Programms sogar besser als die von CLOGP.

und hatte ein niedrigeres LUMO als das unsubstituierte 2AN **6**. Ursache für dieses ungewöhnliche Verhalten ist wahrscheinlich die starke Verzerrung des Moleküls, die auf die sterische Wechselwirkung der *tert*-Butylgruppe mit dem *peri*-Wasserstoffatom zurückzuführen ist (der *tert*-Butylsubstituent ist um 23 ° aus der Aromatenebene abgeknickt).

Tabelle 56: Strukturparameter, experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten bei *ortho*-alkylierten 2-Aminonaphthalinen, 2-Aminofluorenen und 4-Aminobiphenylen.

Verbindung		log P ^a	E _{LUMO}	E _{HOMO}	log (Revertanten/nmol)			
					TA98+S9		TA100+S9	
					Vorhersage	Experiment	Vorhersage	Experiment
2AN	6	2.28 ^b	-0.175	-8.227	-0.33	-1.43	0.00	0.05
1Et-2AN	308	3.29	-0.169	-8.127	0.82	0.31	1.07	1.28
1 <i>i</i> Pr-2AN	309	3.71	-0.172	-8.102	1.28	-0.62	1.49	0.68
1 <i>n</i> Bu-2AN	310	4.27	-0.171	-8.124	1.88	0.42	1.98	1.04
1 <i>t</i> Bu-2AN	311	4.16	-0.179	-8.052	1.79	< -2	1.97	-0.82
2AF	4	3.14 ^b	-0.098	-8.107	1.75	1.50 ^d	0.87	1.03
1Et-2AF	312	4.14	-0.073	-8.060	2.87	1.73 ^d	1.82	1.02
1 <i>i</i> Pr-2AF	313	4.55	-0.051	-8.023	3.34	2.11 ^d	2.21	1.21
1 <i>n</i> Bu-2AF	314	5.12	-0.065	-8.045	3.94	2.75 ^d	2.72	0.75
1 <i>t</i> Bu-2AF	315	5.01	-0.041	-7.997	3.86	0.00 ^d	2.65	-0.35
4ABp	2	2.86 ^b	0.045	-8.274	-0.33	0.65	0.25	0.81 ^c
3Et-4ABp	316	3.88	0.073	-8.214	0.82	0.17	1.22	0.89
3 <i>i</i> Pr-4ABp	317	4.30	0.076	-8.210	1.28	-0.01	1.61	0.45
3 <i>n</i> Bu-4ABp	318	4.86	0.072	-8.212	1.88	-0.17	2.13	0.27
3 <i>t</i> Bu-4ABp	319	4.75	0.108	-8.170	1.79	-0.38	2.03	0.42
3,5DiMe-4ABp	320	3.93	0.088	-8.166	0.92	-1.33	1.31	-0.36
3,5DiEt-4ABp	321	4.92	0.096	-8.150	2.01	-1.72	2.23	-0.53
3,5Di <i>i</i> Pr-4ABp	322	5.75	0.114	-8.144	2.90	< -2	2.98	-1.31

^a Berechnet mit KOWWIN. ^b Experimenteller log P. ^c Mittelwert aus Daten von Schmitt, dieser Arbeit und Debnath. ^d Daten skaliert. ^e Weil die Orbitalenergien von geometrieoptimierten Strukturen berechnet wurden, gibt es geringe Unterschiede zu den Werten, die von Debnath and Hansch benutzt wurden.

Bei den 4-Aminobiphenylen **2**, **316** - **322** ist zudem zu erkennen, daß beim Einfluß von Alkylresten auf die Orbitalenergien additive Effekte (Anzahl der Alkylreste) wichtiger als die Art des Alkylsubstituenten waren (primär, sekundär, tertiär). Zwei *ortho*-Methylsubstituenten (**320**) hoben die Orbitalenergien stärker an als ein *iso*-Propyl- oder *n*-Butylrest (**317**, **318**).

Tabelle 57: Strukturparameter, experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten bei ortho-alkylierten 4-Nitrobiphenylen

Verbindung		log P ^a	E _{LUMO} ^c	log (Revertanten/nmol)			
				TA98-S9		TA100-S9	
				Vorhersage	Experiment	Vorhersage	Experiment
4NBp	1	3.57 ^b	-1.229	-0.15	-0.07	0.40	0.02
3Me-4NBp	323	4.12	-1.175	0.10	-0.34	0.92	0.38
3Et-4NBp	324	4.61	-1.159	0.29	-1.27	1.40	0.15
3 <i>i</i> Pr-4NBp	325	5.03	-1.089	0.24	-1.39	1.59	-0.39
3 <i>t</i> Bu-4NBp	326	5.48	-0.812	-0.34	< -2	1.16	-1.68
3,5DiEt-4NBp ^c	327	5.65	-0.959	-0.30	-1.51	1.42	-0.56
3,5Di <i>i</i> Pr-4NBp	328	6.49	-0.781	-1.90	-1.96	0.09	< -2
3,5Di <i>t</i> Bu-4NBp	329	7.39	-0.688	< -2	< -2	-1.89	< -2

^a Berechnet mit KOWWIN, unterscheiden sich etwas von den Werten, die mit CPLOG berechnet wurden. ^b Experimenteller log P. ^c Weil die Orbitalenergien von geometrieoptimierten Strukturen berechnet wurden, gibt es geringe Unterschiede zu den Werten, die von Debnath and Hansch benutzt wurden.

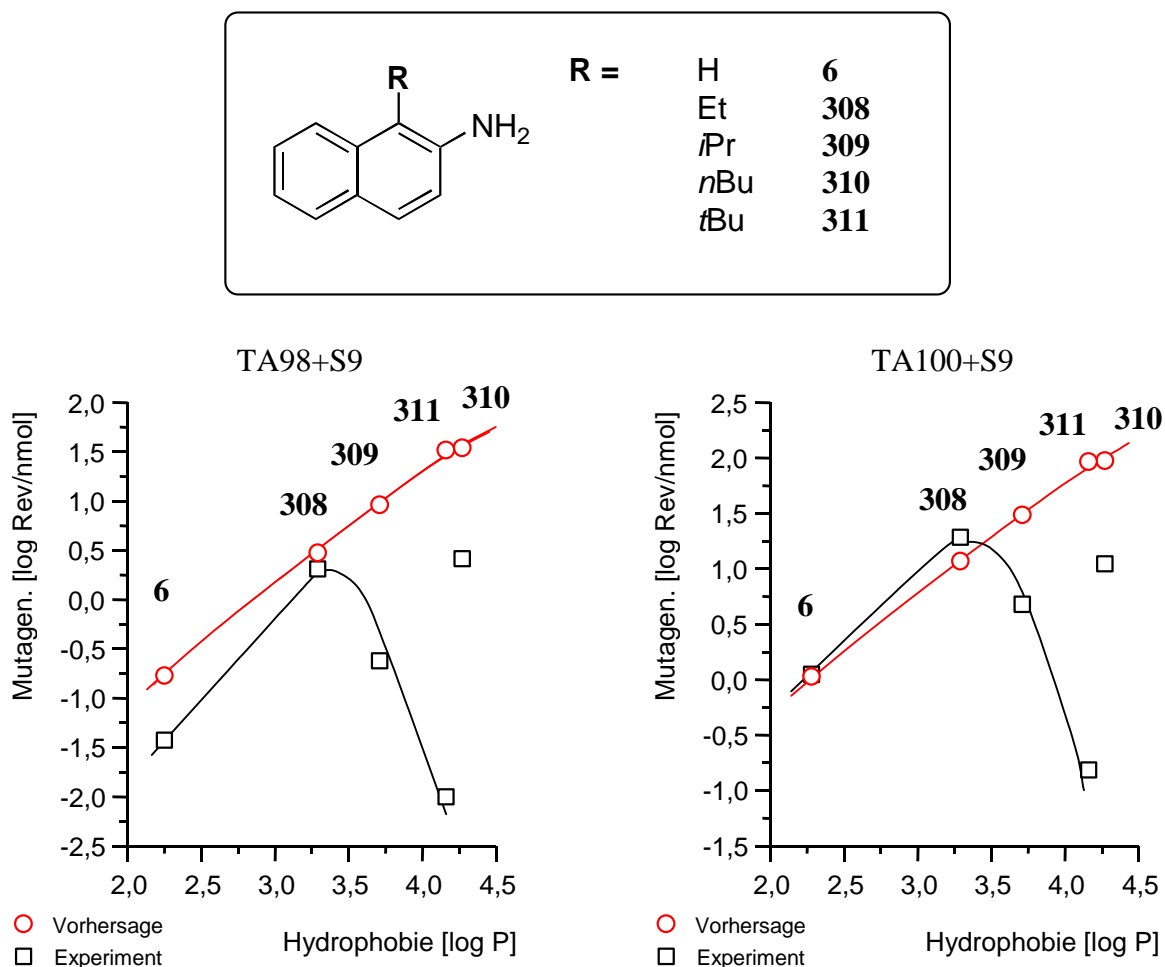
Bei den *ortho*-alkylierten Nitrobiphenylen **1**, **323** - **329** (Tabelle 57) ergaben sich ganz ähnliche Ergebnisse. Da Nitrogruppen die Hydrophobie viel weniger verringern als Aminofunktionen, lagen die log P-Werte wesentlich höher als bei den Aminoaromaten (etwa um 0.8 Einheiten = Faktor 6) und erreichten bei den dialkylierten Verbindungen Werte > 6. Obwohl die Vorhersagen von sehr hohen log P-Werten häufig nicht besonders präzise sind, kann man davon ausgehen, daß der generelle Trend (größerer Alkylrest → höherer log P) richtig wiedergegeben ist. Auch die LUMO-Energien waren durch die stark elektronenziehende Nitrogruppe im Vergleich zu den Aminobiphenylen stärker abgesenkt. Während die LUMOs bei den 4-Aminobiphenylen jeweils > 0 waren, lagen die Orbitalenergien bei den entsprechenden Nitroaromaten alle im negativen Bereich. HOMO-Energien sind in den QSAR-Gleichungen für Nitroaromaten nicht enthalten und daher hier auch nicht angegeben. Da sich sehr kleine Mutagenitäten nur schlecht genau bestimmen lassen, wurden logarithmische Mutationsraten kleiner -2 (< 0.01 Revertanten/nmol) generell – also auch bei den Vorhersagen – auf -2 gesetzt.

Graphische Vergleiche zwischen Vorhersagen und Mutagenität sind für alle Verbindungen (Amino- und Nitroaromaten) in Abb. 112 - Abb. 114 gezeigt und werden im folgenden diskutiert. Um den Effekt der Alkylgruppen zu verdeutlichen, werden jeweils nur Verbindungen mit demselben Grundgerüst miteinander verglichen. Die Substanzen sind dabei nach steigen-

der Hydrophobie geordnet. Diese Reihenfolge entspricht im allgemeinen auch der Zunahme des sterischen Anspruchs.

G.1.1.1 Aminoaromaten

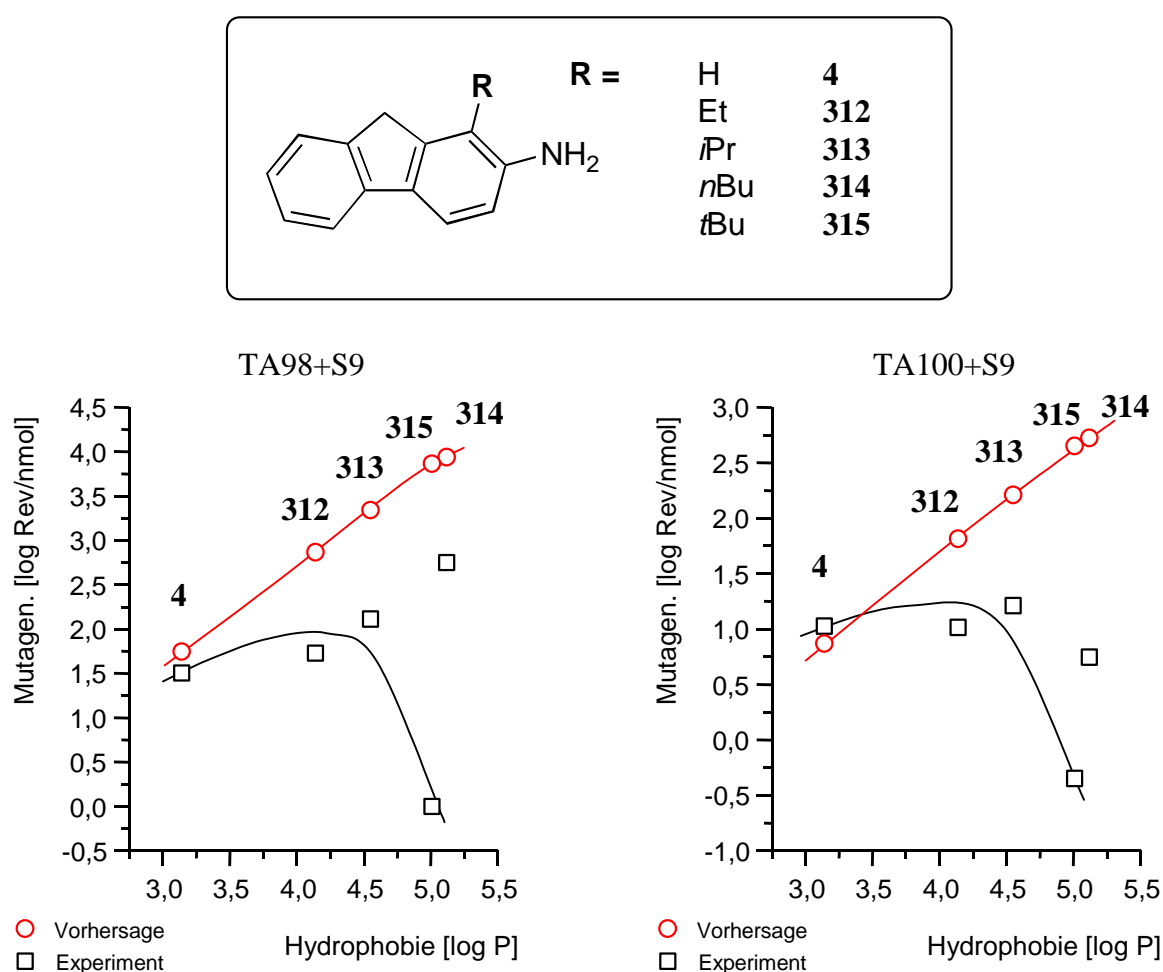
Abb. 112: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten ortho-alkylierter 2-Aminonaphthaline



Die Debnath-Hansch-Gleichungen sagen für die 2-Aminonaphthaline in beiden *Salmonella*-Stämmen eine stetige Zunahme der Mutagenität mit der Hydrophobie voraus, und zwar etwa um eine Größenordnung von 2.5 Einheiten (Faktor: ~300). Die geringen Unterschiede in den HOMO- und LUMO-Energien beeinflussen den Verlauf der Kurven kaum. Experimentell wurde diese Zunahme allerdings nur beim Übergang vom Grundkörper **6** zur Ethylverbindung **308** beobachtet. Für die Derivate **309** und **311** mit den größeren Alkylresten (*iso*-Propyl, *tert*-Butyl) laufen die Kurven scherenartig auseinander – statt des vorhergesagten Anstiegs wird die Mutagenität drastisch reduziert. Ein klares Indiz dafür, daß diese Abnahme der Mutagenität auf einen sterischen Einfluß zurückzuführen ist, ergibt sich aus den experimentellen Daten

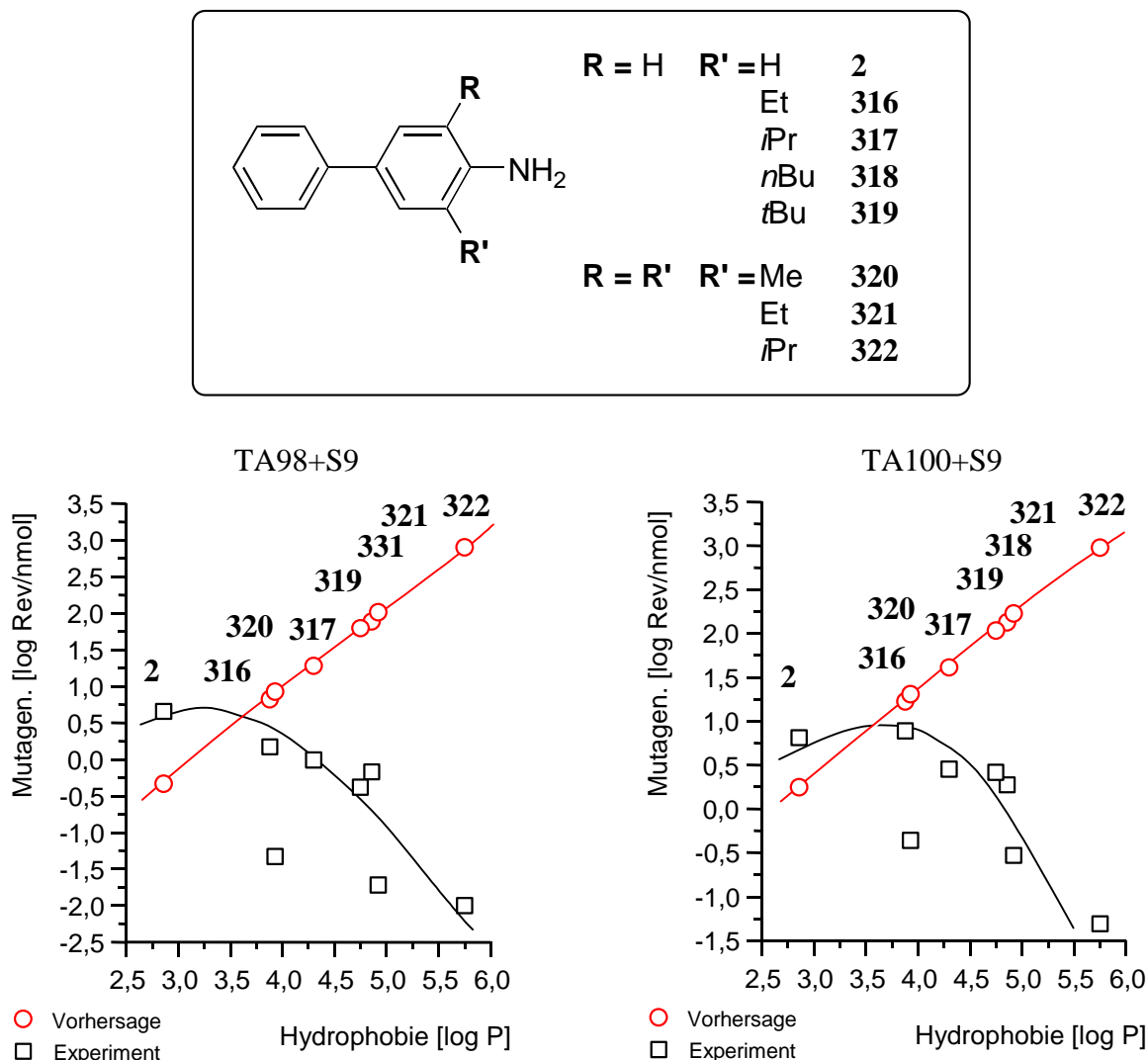
der *n*-Butylverbindung **310**, die in TA98+S9 von allen getesteten Substanzen den größten log P-Wert hat. Nach dem Taft-Modell (siehe Abschnitt D.3.3) ist ihr sterischer Anspruch ($E_s = -1.63$) zwischen dem der Ethyl- ($E_s = -1.31$) **308** und der *iso*-Propylgruppe ($E_s = -1.71$) **309** einzuordnen. Tatsächlich spiegeln die mutagenen Potentiale von **308**, **309** und **310** diese Reihenfolge auch gut wider. Der eingezeichnete Kurvenverlauf soll diese Abhängigkeit vom sterischen Anspruch darstellen. Die *n*-Butylverbindung **310**, bei der sterischer Anspruch und Hydrophobie nicht miteinander gekoppelt sind, liegt daher nicht auf der Kurve.

Abb. 113: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten *ortho*-alkylierter 2-Amino-fluorene



Völlig analoge Graphen ergaben sich bei den *ortho*-alkylierten 2-Aminofluorenen (Abb. 113). Während ein starker Anstieg mit zunehmender Hydrophobie vorhergesagt wurde, fand man experimentell eine Reduktion der Mutagenität. Interessanterweise liegt genau wie bei den alkylierten 2-Aminonaphthalinen auch *1n*Bu-2AF **314** aufgrund des geringeren sterischen Anspruchs der *n*-Butylgruppe wieder wesentlich näher an den vorhergesagten Werten als die *tert*-Butylverbindung **315**.

Abb. 114: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten *ortho*-alkylierter 4-Aminobiphenyle



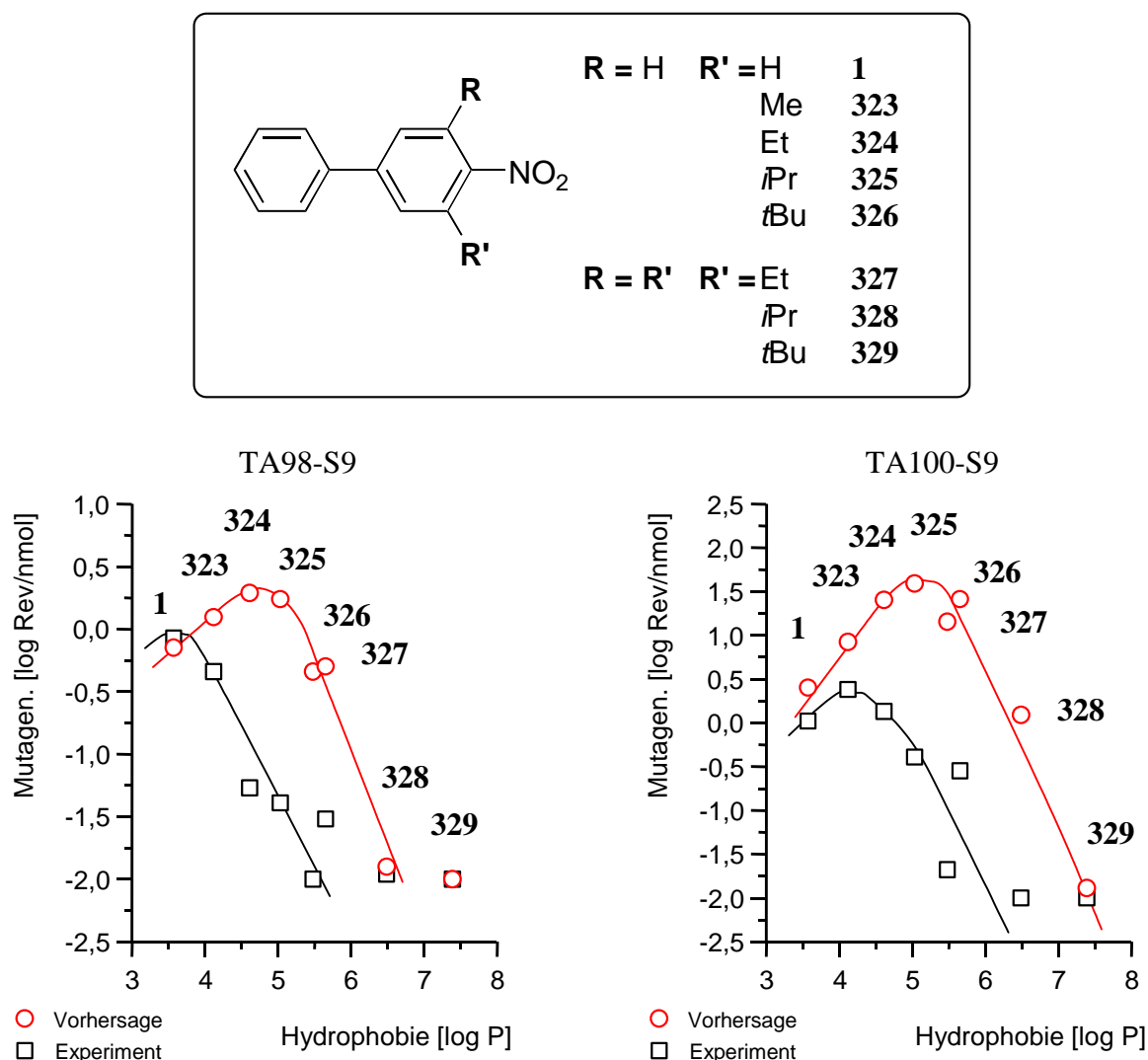
Bei den 3-Alkyl-4-aminobiphenylen (Abb. 114) wurde dieses besondere Verhalten bei 3*n*Bu-4ABp **318** zwar nicht beobachtet, jedoch finden sich auch hier klare Hinweise auf die Bedeutung sterischer Effekte. So zeigte 3,5DiMe-ABp **320** eine viel geringere Mutagenität als 3Et-4ABp **316**, obwohl sich die log P-Werte von **320** und **316** kaum voneinander unterschieden und dementsprechend auch die vorgesagten Mutagenitäten sehr ähnlich sind. Setzt man ein additives Verhalten der sterischen Effekte voraus, stellt man fest, daß im Einklang mit den experimentellen Daten zwei *ortho*-Methylgruppen ($\Sigma E_s = -2.48$) einen viel stärkeren sterischen Effekt ausüben als eine *ortho*-Ethylgruppe ($E_s = -1.31$). Auch hier lassen sich die experimentellen Unterschiede offensichtlich gut durch sterische Effekte erklären und unterstreichen damit, wie wichtig es ist, den sterischen Anspruch bei Vorhersagen der Mutagenität mitzubetrachten.

Fazit: In ihrer jetzigen Form sind die QSAR-Gleichungen (8) und (9) völlig ungeeignet, die experimentellen Trends bei *ortho*-alkylierten Aminoaromaten richtig vorherzusagen.

G.1.1.2 Nitroaromaten

Bei den *ortho*-alkylierten Nitrobiphenylen sehen sich die experimentellen und die vorhergesagten Kurven in beiden Stämmen auf den ersten Blick relativ ähnlich (Abb. 115). Dies ist auf die bilineare Abhängigkeit der Mutagenität von der Hydrophobie in den Gleichungen (10) und (11) zurückzuführen. Es ist jedoch zu beachten, daß in Abb. 115 ein sehr großer Hydrophobiebereich abgedeckt wird, so daß die graphische Darstellung die wirkliche Bedeutung von sterischen Einflüssen etwas verfälscht.

Abb. 115: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten *ortho*-alkylierter 4-Nitrobiphenyle



Betrachtet man jeweils nur den ersten Teil der Kurven (bis $\log P \sim 5.5$), ergeben sich nämlich ganz ähnliche Effekte wie bei den entsprechenden Aminen. In beiden Stämmen wird auch hier ein Anstieg der Mutagenität mit zunehmender Hydrophobie vorhergesagt. Die Übereinstimmung mit den experimentellen Werten ist jedoch nur für 4NBp **1** und 3Me-4NBp **323** gut, während die Abweichungen zwischen Vorhersage und Experiment für die anderen Verbindungen mit steigendem sterischen Anspruch der Alkylresten zunehmen. Tatsächlich treten die größten Differenzen in beiden Teststämmen wieder für die Derivate **325** und **326** mit *iso*-Propyl- bzw. *tert*-Butylrest auf. Erst wenn der optimale $\log P$ -Wert überschritten ist, wie bei den sehr hydrophoben dialkylierten Derivaten **327** - **329**, wird der weitere Abfallⁱ tendenziell richtig wiedergegeben. Während die Vorhersagen für 3,5-Di*i*Pr-4NBp **328** dabei in TA98 besser als in TA100 sind, wird die Inaktivität von 3,5-Di*t*Bu-4NBp **329** in beiden Fällen gut vorhergesagt.

Nach Debnath und Hansch ist die Aktivitätsabnahme bei sehr hydrophoben, unsubstituierten Nitroaromaten auf eine Kombination von ungünstigen hydrophoben und sterischen Wechselwirkungen zurückzuführen, die in diesem Bereich ($\log P > 6$) offenbar parallel zunehmen. Der Vergleich in Abb. 115 zeigt jedoch, daß sterische Effekte durch große Alkylgruppen schon bei viel niedrigeren $\log P$ -Werten auftreten. Die sterischen Effekte von Alkylgruppen müssen also von den Effekten, die die Gleichungen (10) und (11) durch ihren bilinearen Verlauf bereits berücksichtigen, klar unterschieden werden. Insgesamt scheinen aber extrem hohe $\log P$ -Werte immer zu einer Reduktion des mutagenen Potentials zu führen, unabhängig davon, ob die Nitroverbindung ein rein aromatisches oder Alkyl-substituiertes Kohlenstoffskelett aufweist.

Zusammengefaßt gilt, daß die Effekte von sperrigen Alkylgruppen auch bei *ortho*-alkylierten Nitroaromaten falsch vorhergesagt werden, sofern die Hydrophobie keine extrem hohen Werte ($\log P > 6$) erreicht.

G.1.2 *Para*-alkylierte Verbindungen

Wie sieht es bei den *para*-Alkyl-substituierten Verbindungen aus? Versagen die Debnath-Hansch-Gleichungen auch hier oder werden sterische Effekte an dieser Position besser wiedergegeben?

Für die Vorhersage mit den QSAR-Gleichungen (8) - (11) wurden alle Verbindungen wieder nach dem AM1-Verfahren geometrieoptimiert und danach ihre Orbitalenergien bestimmt. Die

ⁱ Geringere Mutagenitäten als -2 wurden nicht berücksichtigt.

log P-Werte wurden mit KOWWIN ermittelt und die experimentellen Revertantenzahlen über den Logarithmus umgerechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 58 (Nitroaromaten) und Tabelle 59 (Aminoaromaten) zusammengefaßt.

Tabelle 58: Strukturparameter, experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten para-alkylierter Nitroaromaten

Verbindung		log P ^a	E _{LUMO} ^c	log (Revertanten/nmol)			
				TA98-S9		TA100-S9	
				Vorhersage	Experiment	Vorhersage	Experiment
4NBp	1	3.57	-1.229	-0.15	-0.42	0.40	0.06
4'Me-4NBp	94	4.12	-1.208 ^c	0.14	-0.66	0.99	-0.62
4'Et-4NBp	95	4.61	-1.206	0.35	-0.98	1.50	-0.62
4'iPr-4NBp	96	5.03	-1.201	0.39	-1.96	1.82	< -2
4'tBu-4NBp	97	5.48	-1.193	0.19	< -2	1.94	-1.67
4'nBu-4NBp	98	5.59	-1.198	0.09	-1.14	1.93	-0.87
4'Ad-4NBp	102	7.19	-1.189	< -2	< -2	-0.43	-1.84
4NTp	103	5.34	-1.270	0.39	< -2	2.09	-1.97
3'Me-4NBp	99	4.12	-1.207	0.14	-0.81	0.99	-0.20
3',5'DiMe-4NBp	100	4.67	-1.184	0.34	-1.84	1.51	-0.76
3',5'Di <i>t</i> Bu-4NBp	101	7.39	-1.151	< -2	-1.93	-0.94	-0.90
5Ph2NP	104	2.39	-1.398	-0.67	-0.52	-0.66	-1.13
4'tBu-5Ph2NP	105	4.30	-1.357	0.44	-1.48	1.49	-1.85
2Ph5NP	106	2.39	-1.515	-0.51	-0.54	-0.42	0.09
4'tBu-2Ph5NP	107	4.30	-1.475	0.60	-1.70	1.74	-0.80
2NF	3	3.37 ^b	-1.302 ^c	1.71	1.16	0.32	0.85
7Me-2NF	108	4.38	-1.279	2.25	1.19	1.42	0.81
7 <i>t</i> Bu-2NF	109	5.74	-1.257	1.89	-0.43	1.98	-0.51
7Ad-2NF	110	7.44	-1.257	-1.40	-1.03	-0.83	< -2

^a Berechnet mit KOWWIN. ^b Experimenteller log P. ^c Weil die Orbitalenergien von geometrieoptimierten Strukturen berechnet wurden, gibt es geringe Unterschiede zu den Werten, die von Debnath and Hansch benutzt wurden.

Im Hinblick auf die Hydrophobie ergab sich die schon beschriebene Abhängigkeit von Größe und Anzahl der Alkylsubstituenten. Die Nitroverbindungen 4'Ad-4NBp **102**, 3',5'Di*t*Bu-4NBp **101** und 7Ad-2NF **110** mit log P-Werten größer als 7, bzw. die Amine 7*t*Bu-2AF **120** und 7Ad-2AF **121**, gehören zu den am stärksten hydrophoben Verbindungen, die je getestet wurden. Im Gegensatz zur Hydrophobie, die in beiden Reihen Variationen um mehrere Größen-

ordnungen (Nitroaromaten log P: 3.57 - 7.44; Aminoaromaten log P: 2.86 - 6.71; Faktor 10000) umfaßte, änderten sich die Molekülorbital-Energien mit den Alkylgruppen nur wenig.

Die *para*-alkylierten Nitroaromaten zeigten grundsätzlich eine schwächere Anhebung der LUMOs als die *ortho*-alkylierten Verbindungen, bei denen zusätzlich zum +I-Effekt der Substituenten die Geometrie der Nitrogruppe betroffen war (3*t*Bu-4NBp **326**: -0.812 \Leftrightarrow 4*t*Bu-NBp **97**: -1.193). Bei den heteroaromatischen Verbindungen führte der Austausch des Ringkohlenstoffs gegen den elektronegativeren Stickstoff dagegen zu einer stärkeren Abnahme der LUMO-Energien. Dieser Effekt war außerdem von der Position des ausgetauschten Kohlenstoffs abhängig und in *ortho*-Position zur Nitrogruppe (2Ph5NP **104**) deutlich stärker ausgeprägt als in *meta*-Position (5Ph2NP **106**).

Tabelle 59: Strukturparameter, experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten *para*-alkylierter Aminoaromaten

Verbindung		log P ^a	E _{LUMO} ^c	E _{HOMO} ^c	log (Revertanten/nmol)			
					TA98-S9		TA100-S9	
					Vorhersage	Experiment	Vorhersage	Experiment
4ABp	2	2.86 ^b	0.045	-8.274	-0.33	0.49	0.25	0.68
4'Me-4ABp	111	3.39	0.040	-8.208	0.33	0.64	0.82	0.61
3'Me-4ABp	112	3.39	0.073	-8.256	0.24	0.74	0.72	1.04
3,5'DiMe-4ABp	113	3.93	0.100	-8.239	0.83	0.35	1.21	0.76
4'Et-4ABp	114	3.88	0.043	-8.216	0.84	-0.14	1.26	0.45
4'iPr-4ABp	115	4.30	0.056	-8.211	1.29	-0.72	1.63	-0.04
4'tBu-4ABp	116	4.75	0.059	-8.205	1.79	-1.62	2.06	-0.69
5Ph2AP	117	2.29	-0.186	-8.495	-1.07	0.87	-0.26	0.30
4'tBu-5Ph2AP	118	4.20	-0.162	-8.415	1.08	-1.38	1.56	-1.57
2AF	4	3.14 ^b	-0.098	-8.107	1.74	1.26	0.87	1.06
7Me-2AF	119	3.65	-0.100	-8.035	2.39	1.47	1.42	1.09
7 <i>t</i> Bu-2AF	120	5.01	-0.078	-8.036	3.84	-0.20	2.65	0.50
7Ad-2AF	121	6.71	-0.082	-8.034	5.68	-0.94	4.22	-1.26

^a Berechnet mit KOWWIN. ^b Experimenteller log P. ^c Weil die Orbitalenergien von geometrieoptimierten Strukturen berechnet wurden, gibt es geringe Unterschiede zu den Werten, die von Debnath and Hansch benutzt wurden.

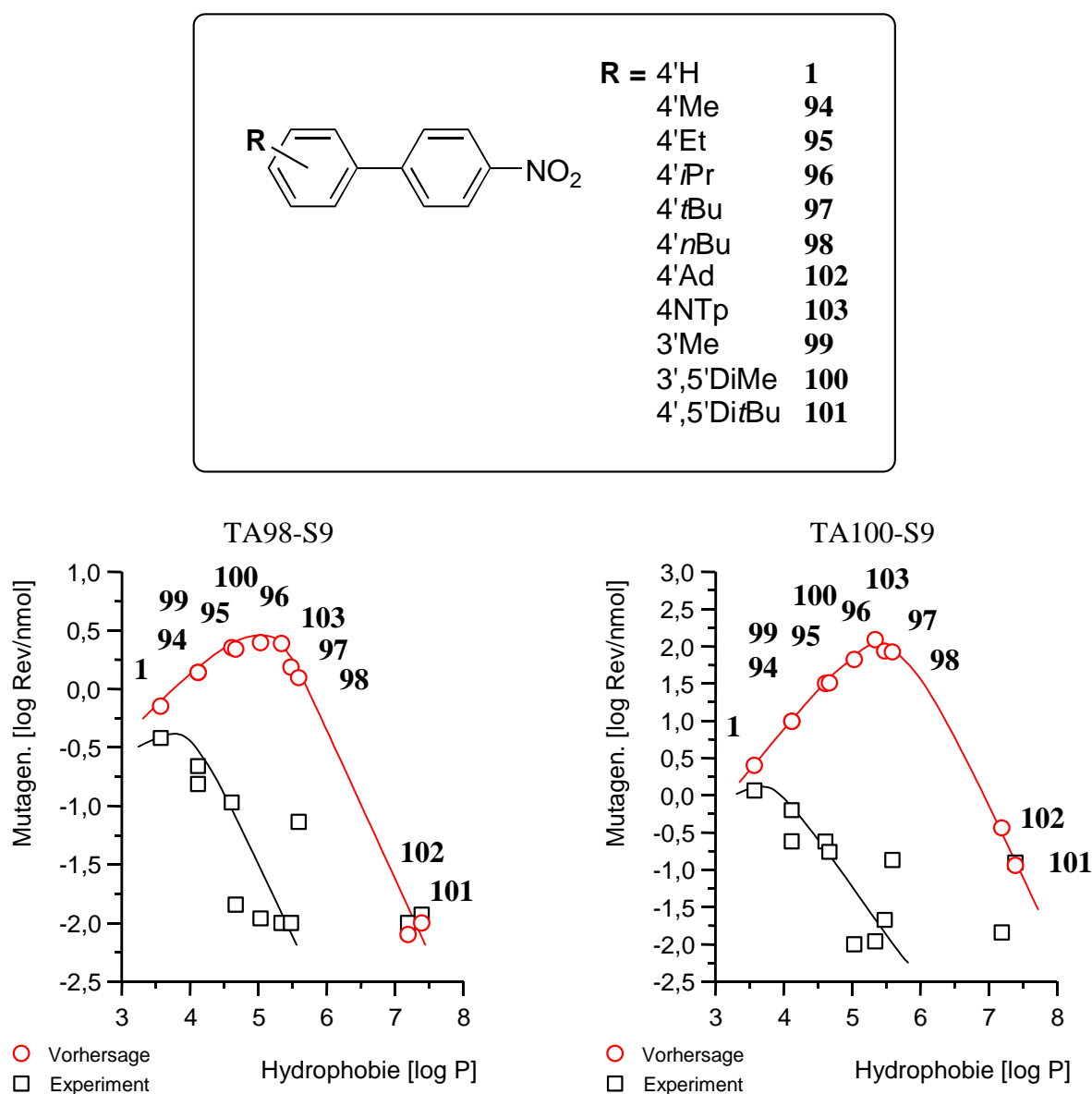
Ein interessanter Effekt ergab sich bei den Aminen mit kleinen Alkylsubstituenten in *para*-Position. Anstelle eines Anstieges von HOMO und LUMO kam es bei 4'Me-4ABp **111**, 4'Et-4ABp **112** und 7Me-2AF **119** zu einer Absenkung der LUMOs, während die HOMOs ange-

hoben wurden. Im Vergleich zu den Grundkörpern **2** und **4** sind also bei **111**, **112** und **119** die Abstände der Orbitalenergien verringert. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf verstärkte Elektronendelokalisation zurückzuführen.

G.1.2.1 Nitroaromaten

Der graphische Vergleich zwischen den vorhergesagten und experimentellen Mutagenitäten (jeweils in Abwesenheit von S9-Mix) ist für die *para*-alkylierten Nitroaromaten in Abb. 116 - Abb. 118 dargestellt. In Abb. 116 sind alle Alkylderivate von 4NBp **1** und das "Phenylderivat" 4NTP (aus den Testserien **2-I**, **2-II**, **2-III**) miteinbezogen worden.

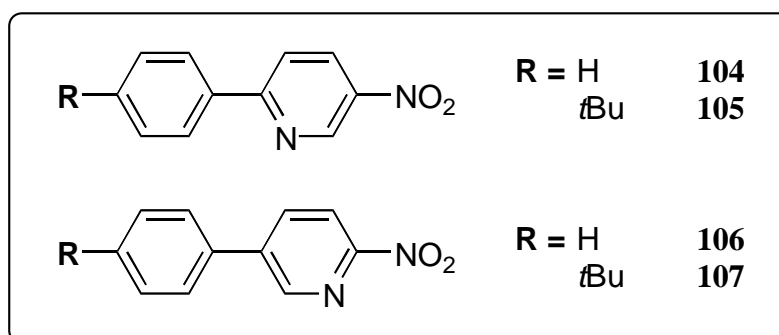
Abb. 116: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten 4'-alkylierter 4-Nitrobiphenyle



In TA98 sollte nach den Vorhersagen der Debnath-Hansch-Gleichungen die Mutagenität ausgehend vom Grundkörper 4NBp mit der Hydrophobie erst stetig steigen (4NBp **1** < 4'Me **94**, 3'Me **99** < 3',5'DiMe **100**, 4'Et **95** < 4'iPr **96**, 4NTP **103**), um dann, nach Überschreitung des optimalen log P-Wertes, wieder abzufallen (4NTP **103** > 4'tBu **97** > 4'nBu **98**). Die sehr stark hydrophoben Verbindungen **102** und **101** (4'Ad, 3',5'Di*t*Bu) wurden als inaktiv vorhergesagt. Im Gegensatz zu dieser Vorhersage sanken die experimentellen Mutagenitäten aber bereits beginnend mit der methylsubstituierten Verbindung **94** kontinuierlich mit der Größe und Anzahl der Alkylsubstituenten ab. Nur Substanz **98** (4'nBu-NBp) mit der flexibleren und sterisch weniger anspruchsvollen *n*-Butylgruppe wies eine vergleichsweise hohe Aktivität auf. Es trat hier also derselbe Effekt auf, der schon bei den *ortho-n*-Butylderivaten von 2-Aminonaphthalin und 2-Aminofluoren aufgefallen war. Ganz ähnliche Resultate erhielt man auch in TA100. Da in diesem Stamm sogar ein deutlich steilerer Anstieg mit der Hydrophobie vorhergesagt wurde, waren die absoluten Unterschiede noch etwas größer. Bei den *para*-alkylierten Nitrobiphenylen gibt es also eine gute Übereinstimmung nur für den unsubstituierten Grundkörper 4NBp **1**, während die Abweichungen zwischen Vorhersage und Experiment mit steigendem sterischen Anspruch der Alkylgruppen stetig wachsen. Aufgrund der bilinearen Abhängigkeit der Mutagenität von der Hydrophobie wird die Inaktivität der extrem hydrophoben Verbindungen dagegen wieder gut wiedergegeben.

Bei den heteroaromatischen Analoga **104** - **107** wurde derselbe Trend beobachtet (Abb. 117). Die Vorhersagen waren für die unsubstituierten Verbindungen **104** und **106** in beiden Stämmen noch relativ richtig, aber viel zu hoch für ihre Derivate **105** und **107** mit den *tert*-Butylgruppen.

Abb. 117: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten 4'-alkylierter Aza-4-nitrobiphenyle



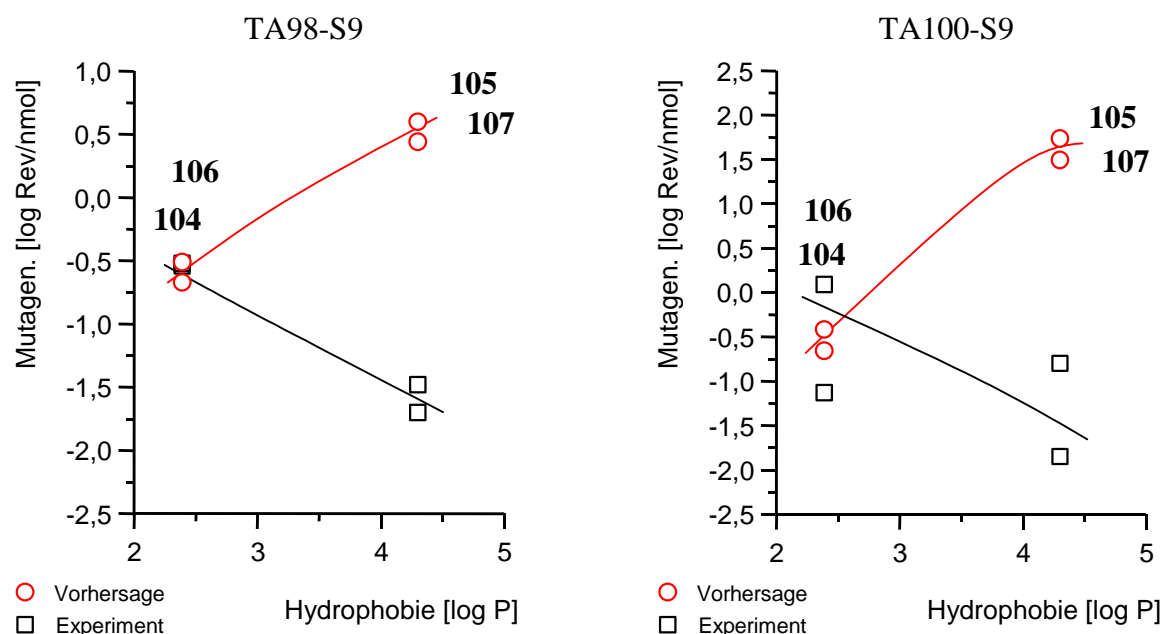
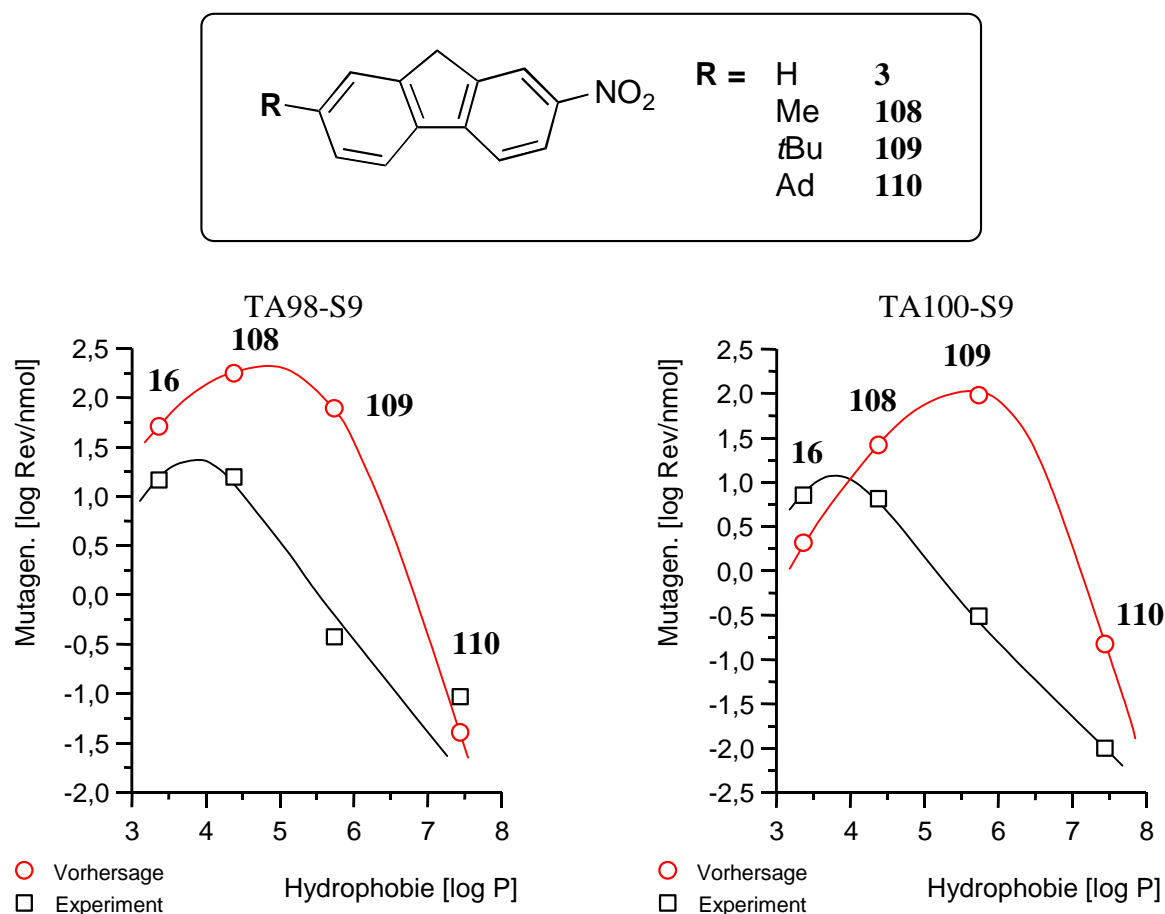


Abb. 118: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten 7-alkylierter 2-Nitrofluorene



Ähnliches galt für die 7-Alkyl-2-nitrofluorene (Abb. 118). Trotz der vergleichsweise geringeren Anzahl an Vergleichssubstanzen erkennt man, wie sehr sich die Kurvenverläufe in Abb. 116 und in Abb. 118 in TA98 und TA100 gleichen. Bei der *tert*-Butyl-Verbindung (7*t*Bu-2NF

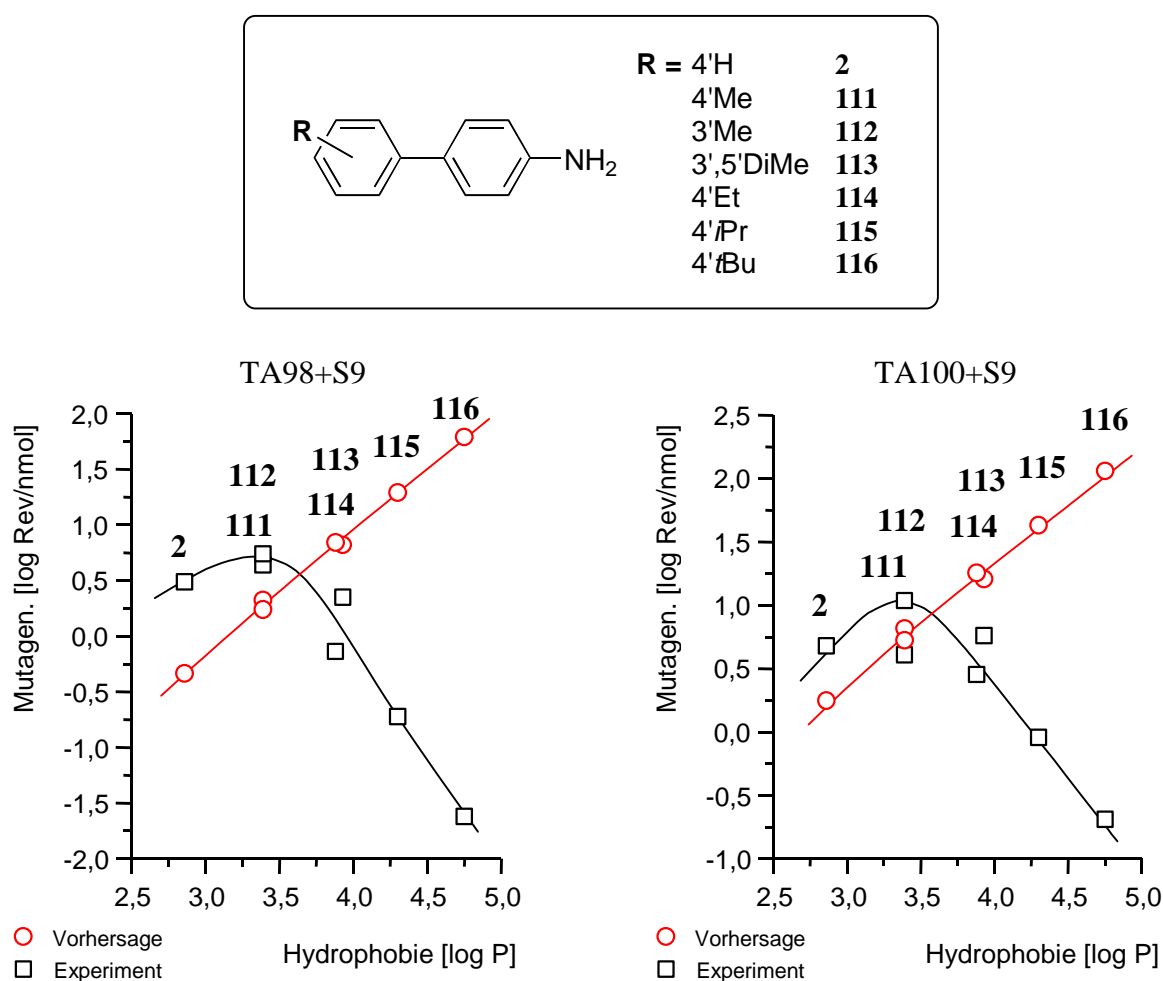
109) waren die Abweichungen jeweils am größten, während für das sehr viel hydrophobere Adamantylderivat (7Ad-2NF **110**) die experimentell gefundene geringe Mutagenität tendenziell richtig vorhergesagt wurde.

Fazit: Insgesamt gesehen findet man bei den *para*-Alkyl-substituierten Nitroaromaten ein völlig analoges Ergebnis wie bei den *ortho*-alkylierten Verbindungen. Die fehlende Berücksichtigung des sterischen Einflusses von Alkylgruppen führt also unabhängig von der Position zu falschen Mutagenitätsvorhersagen für Nitroaromaten mit großen Alkylresten (*i*Pr, *t*Bu) und log P-Werten < 6.

G.1.2.2 Aminoaromaten

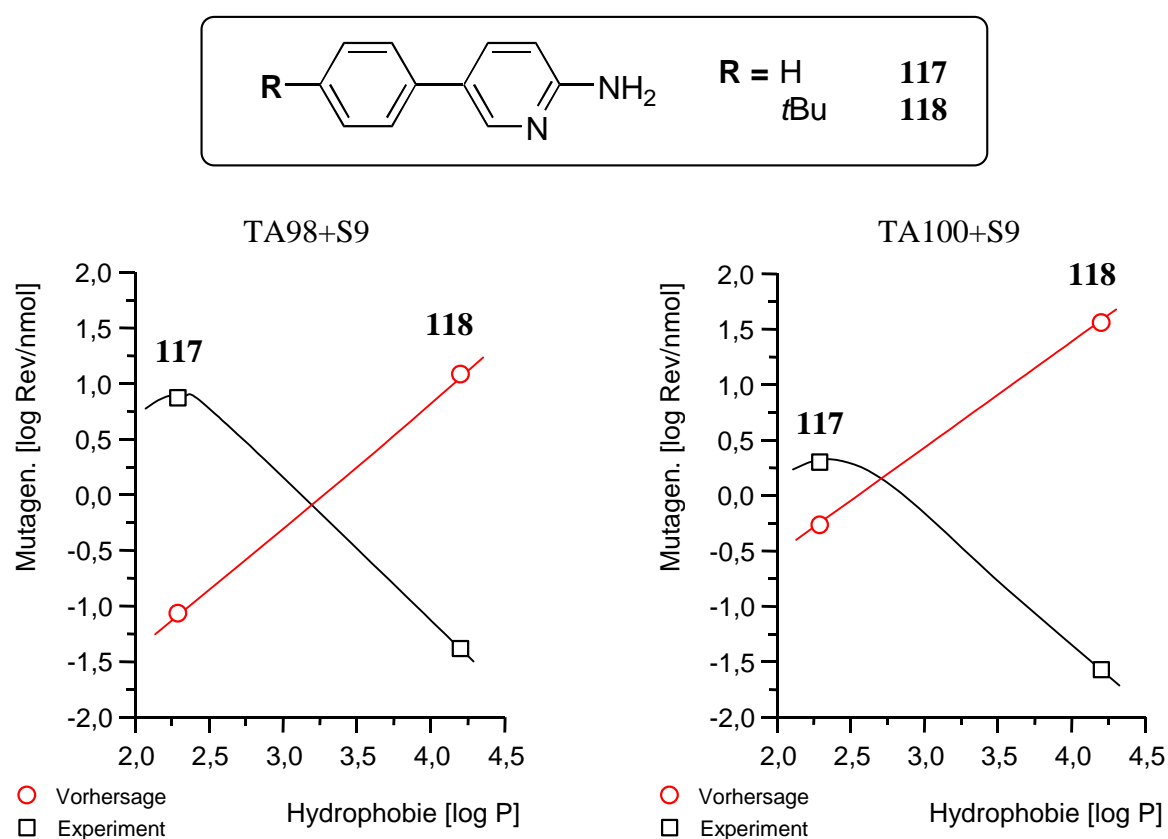
Da schon bei den *ortho*-alkylierten Verbindungen die entsprechenden Alkylgruppeneffekte bei Amino- und Nitroaromaten grundsätzlich sehr ähnlich waren, verwundert es nicht, daß auch bei den *para*-alkylierten Aminen Vorhersagen und experimentelle Befunde nicht übereinstimmen. Dies ist aus Abb. 119 - Abb. 121 klar ersichtlich.

Abb. 119: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten 4'-alkylierter 4-Aminobiphenyle



Bei den Aminobiphenylen (Abb. 119) fand man jeweils für den Grundkörper **2** und die beiden Methylderivate **111** und **112** gute Übereinstimmungen. Etwas größere Abweichungen traten bei 4'Et-4ABp **114** und 3',5'DiMe-4ABp **113** auf, während bei den Verbindungen mit den sterisch anspruchsvolleren Alkylresten (4'*i*Pr-4ABp **115**, 4'*t*Bu-4ABp **116**) Vorhersage und Experiment wieder scherenartig auseinander liefen.

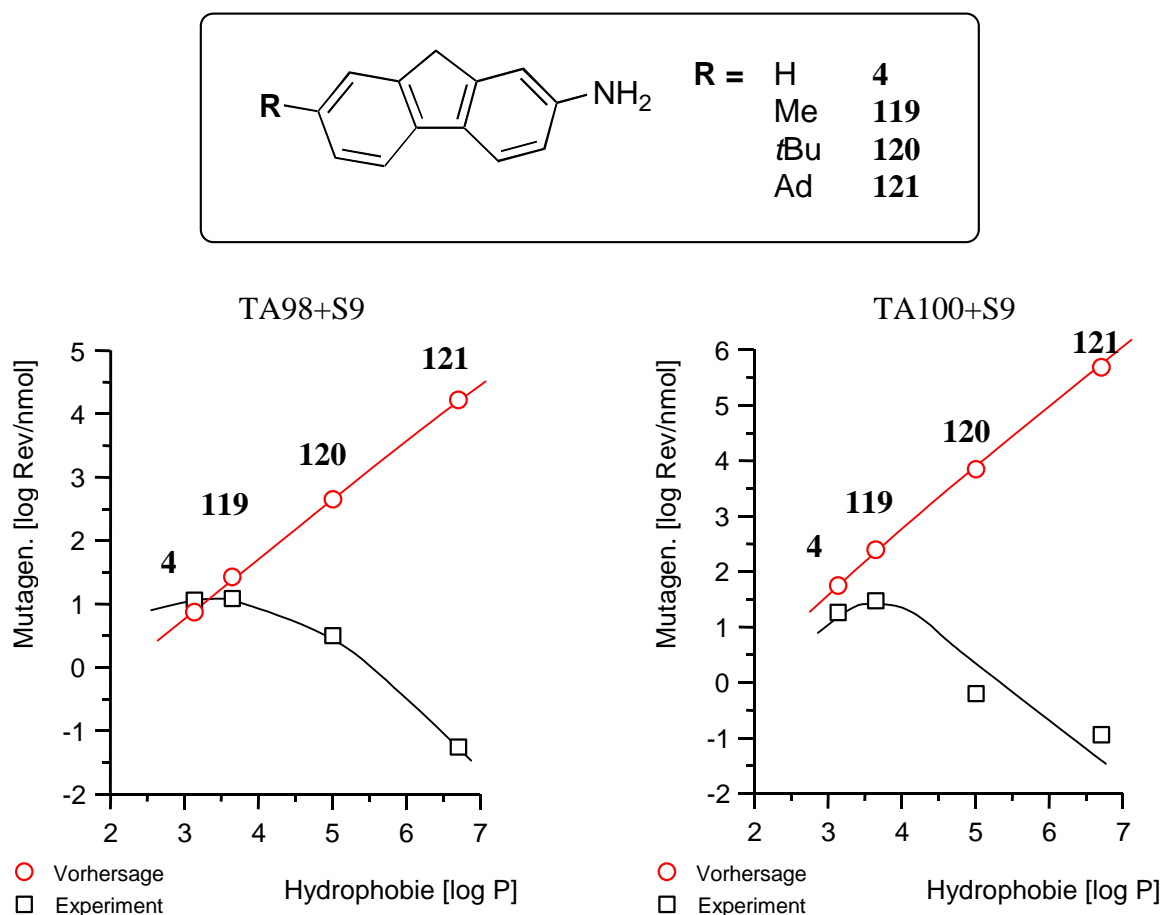
Abb. 120: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten 4'-alkylierter 3-Aza-4-aminobiphenyle



Im Hinblick auf die heteroaromatischen Verbindungen 5Ph2AP **117** und 4'*t*Bu-5Ph2AP **118** zeigte sich sogar beim Grundkörper **117** in TA98 eine große Differenz. Allerdings wurde hier die Mutagenität in Gegensatz zum *tert*-Butylderivat als viel zu gering vorhergesagt.

Völlig analoge Effekte wie bei den 4-Aminobiphenylen ergaben sich bei den *para*-alkylierten 2-Aminofluorenen (Abb. 121). Aufgrund der hohen Hydrophobie des Adamantylderivates betrugen die Unterschiede hier sogar 6 (TA98) bzw. 7 (TA100) Größenordnungen.

Abb. 121: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten 7-alkylierter 2-Aminofluorene



Fazit: Auch bei den *para*-alkylierten Aminoaromaten sind also Hydrophobie und Orbitalenergien allein nicht ausreichend, um die Alkylgruppeneffekte zu erfassen.

G.1.3 Para-alkylierte Nitrostilbene

Obwohl Nitrostilbene andere Addukte als die bisher behandelten Nitroaromaten bilden, war auch bei den Nitrostilbenen ein größenabhängiger Einfluß der Alkylgruppen auf die Mutagenität festgestellt worden (allerdings nur in Abwesenheit von S9-Mix, vgl. F.6). Auch für diese Verbindungen sollen daher die vorhergesagten und die experimentellen Mutagenitäten miteinander verglichen werden. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 60 zusammengefaßt und in Abb. 122 graphisch dargestellt.

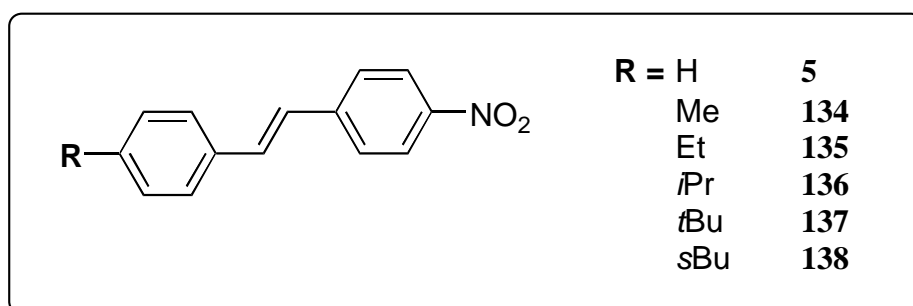
Durch die zusätzliche Doppelbindung zwischen den Phenylringen wiesen alle Nitrostilbene größere log P-Werte als die entsprechenden Nitrobiphenyle auf, ansonsten stieg die Hydrophobie mit der Größe der Alkylsubstituenten an. Die LUMO-Energien wurden von den Alkylsubstituenten nur minimal beeinflusst.

Tabelle 60: Strukturparameter, experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten von 4'-Alkyl-substituierten 4-Nitrostilbenen

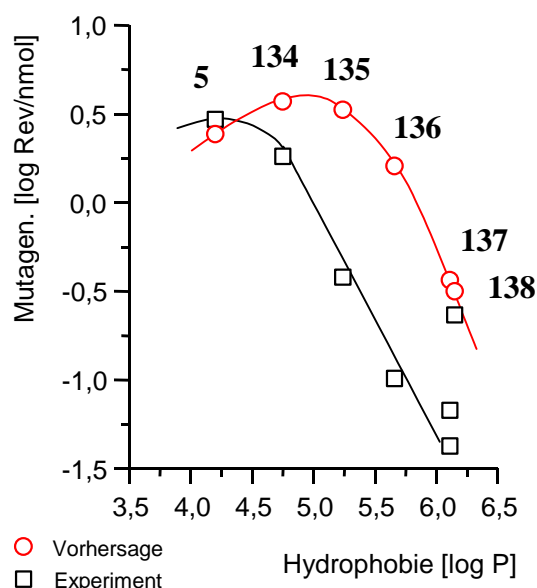
Verbindung		log P ^a	E _{LUMO} ^b	log (Revertanten/nmol)			
				TA98-S9		TA100-S9	
				Vorhersage	Experiment	Vorhersage	Experiment
4NS	5	4.20	-1.356	0.39	0.47	1.38	1.34
4'Me-4NS	134	4.75	-1.339	0.57	0.26	1.90	1.03
4'Et-4NS	135	5.24	-1.333	0.52	-0.42	2.19	0.69
4'iPr-4NS	136	5.66	-1.332	0.21	-0.99	2.18	0.47
4'tBu-4NS	137	6.11	-1.329	-0.44	-1.17	1.79	0.36
4'sBu-4NS	138	6.15	-1.333	-0.50	-0.63	1.74	0.03

^a Berechnet mit KOWWIN. ^b Weil die Orbitalenergien von geometrieoptimierten Strukturen berechnet wurden, gibt es geringe Unterschiede zu den Werten, die von Debnath und Hansch benutzt wurden.

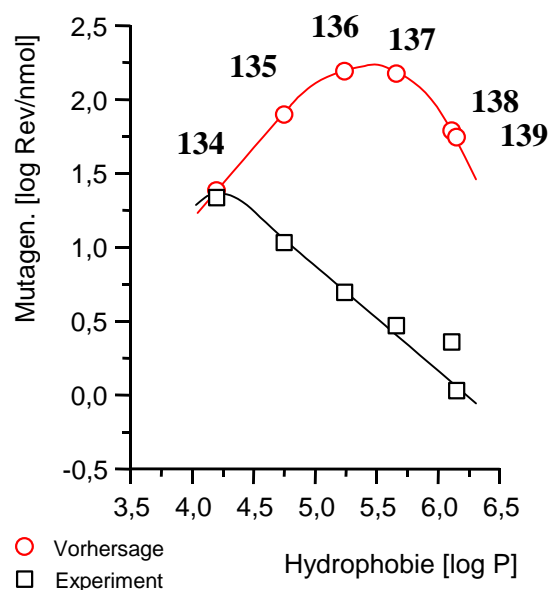
Abb. 122: Experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten 4'-alkylierter 4-Nitrostilbene



TA98-S9



TA100-S9



Im Hinblick auf den Vergleich von Experiment und Vorhersage ähneln die Effekte (Abb. 122) denen, die bei den anderen Nitroaromaten aufgetreten waren. Recht gute Übereinstimmung fand man beim Grundkörper **5** und seinem Methylderivat **134**, während mit zunehmender Größe der Alkylreste die Differenzen zwischen Vorhersage und Experiment anstiegen. Dieser Effekt ist besonders in TA100-S9 gut erkennbar. Aufgrund der hohen Hydrophobie der Nitrostilbene lagen in TA98-S9 die experimentellen und die vorhersagten Mutagenitäten zwar relativ eng beieinander, aber auch hier nahmen die Abweichungen bis zu 4*i*Pr-4NS **136** zu und wurden erst bei den noch stärker hydrophoben Verbindungen **137** und **138** ($\log P > 6$) wieder kleiner.

Damit bestätigt dieser Vergleich die Existenz eines sterischen Effekts auch bei den Alkylsubstituierten Nitrostilbenen. Wie bei den anderen alkylierten Amino-/Nitroaromaten reichen Hydrophobie und Orbitalenergien nicht aus, das mutagene Potential richtig wiederzugeben. Da auch *trans*-Nitrostilbene weitgehend planar sind und diese Planarität durch die Alkylreste verloren geht, kommen als Ursachen dieselben Phänomene wie bei den anderen Amino-/Nitroaromaten (z.B. schlechtere Interkalation in die DNA und Verschiebung der DNA-Konformationen zugunsten des "B-type"-Konformers) in Frage. Die abweichende Struktur der DNA-Addukte scheint den sterischen Effekt also offensichtlich nicht zu beeinflussen.

G.1.4 CF₃-substituierte Verbindungen

Aufgrund der engen Verwandtschaft mit den methylierten Verbindungen der vorhergehenden Abschnitte, wurden auch bei den Trifluormethylderivaten die experimentellen und die vorhergesagten Mutagenitäten miteinander verglichen (Tabelle 61).

Da Fluorsubstituenten generell die Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln erhöhen, wiesen alle Trifluormethylderivate im Vergleich zu den Methylverbindungen größere $\log P$ -Werte auf. Die Orbitalenergien wurden durch den starken -I-Effekt der CF₃-Gruppen jeweils abgesenkt, wobei man deutlich erkennen kann, daß das Ausmaß dieses Effekts in der *para*-Position stärker als in der *meta*-Position ist.

Tabelle 61: Strukturparameter, experimentelle und vorhergesagte Mutagenitäten von para- CF_3 -substituierten Amino-/Nitroaromaten

Verbindung		$\log P^a$	E_{LUMO}^b	E_{HOMO}^b	$\log (\text{Revertanten/nmol})$			
					TA98±S9 ^c		TA100±S9 ^c	
					Vorhersage	Experiment	Vorhersage	Experiment
4' CF_3 -4NBp	126	4.54	-1.579	-	0.84	< -2	2.20	-0.71
3' CF_3 -4NBp	127	4.54	-1.494	-	0.73	< -2	2.02	-1.05
3',5'Di CF_3 -4NBp	128	5.50	-1.771	-	0.97	< -2	3.12	-0.94
7' CF_3 -2NF	129	4.83	-1.693	-	2.95	-0.243	2.69	0.38
4' CF_3 -4ABp	130	3.80	-0.549	-8.584	0.72	-1.46	1.45	-0.85
3' CF_3 -4ABp	131	3.80	-0.401	-8.535	0.67	-1.35	1.33	0.00
3',5'Di CF_3 -4ABp	132	4.77	-0.825	-8.754	1.75	< -2	2.47	-1.82
7' CF_3 -2AF	133	4.10	-0.660	-8.450	2.75	0.91	2.02	0.86

^a Berechnet mit KOWWIN. ^b Weil die Orbitalenergien von geometrieoptimierten Strukturen berechnet wurden, gibt es geringe Unterschiede zu den Werten, die von Debnath and Hansch benutzt wurden. ^c Nitroaromaten-S9, Aminoaromaten+S9

Die Zunahme der Hydrophobie und die Absenkung der LUMOs sollten nach den Vorhersagen der Debnath-Hansch-Gleichungen sowohl bei den Nitro- als auch bei den Aminoaromaten im Vergleich zu den methylsubstituierten Derivaten zu einer Steigerung des mutagenen Potentials führen. Tatsächlich wurde aber im Experiment das Gegenteil gefunden, wie die Daten in Tabelle 61 belegen.

Auch in diesem Fall versagen die Gleichungen wieder und deuten damit an, daß bei den CF_3 -Derivaten ebenfalls sterische Aspekte wichtig sein könnten. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß CF_3 -Substituenten einen ganz ähnlichen E_S -Wert ($E_S = -2.40$) wie *tert*-Butylsubstituenten ($E_S = -2.78$) haben.⁹⁶

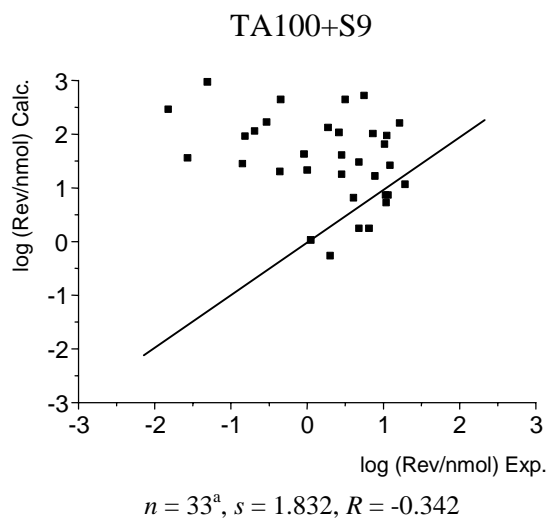
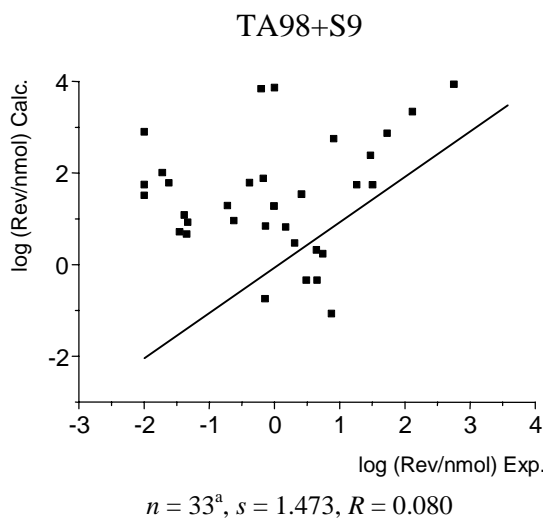
G.2 Anpassung der Debnath-Hansch-Gleichungen

In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, daß die empirischen Gleichungen von Debnath und Hansch ungeeignet sind, die Wirkung von großen Alkylgruppen oder von CF_3 -Substituenten auf die Mutagenität zu beschreiben. Mathematisch kann dieser Zusammenhang durch eine Korrelationsanalyse zwischen den vorhergesagten (Y-Werte) und den experimentellen Daten (X-Werte) veranschaulicht werden.ⁱ

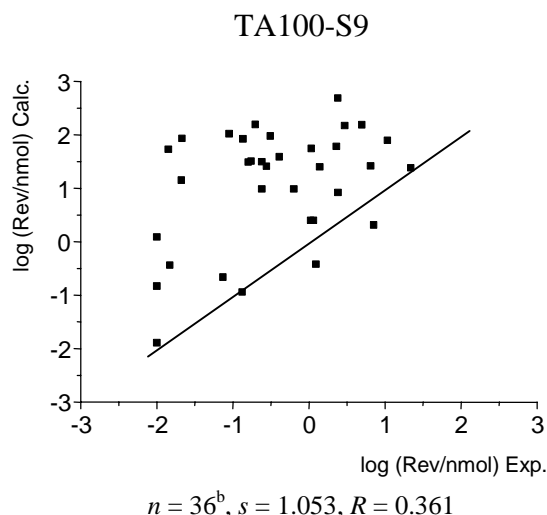
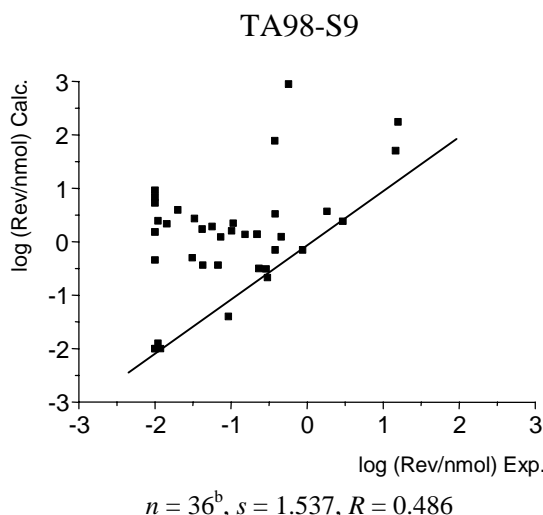
ⁱ Grundsätzlich wurden bei allen Korrelationsanalysen Mutagenitäten < -2 (experimentell oder berechnet) immer auf -2 gesetzt.

Abb. 123: Korrelationsanalyse zwischen den Vorhersagen der Debnath-Hansch-Gleichungen und den experimentellen Daten für alkylierte/ CF_3 -substituierte Amino- und Nitroaromaten

Aminoaromaten



Nitroaromaten



^a n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Verbindungen. Miteinbezogen wurden alle *ortho*-alkylierten Amine (2-Naphthyl, 2-Fluorenyl, 4-Biphenyl) und alle *para*-alkylierten/ CF_3 -substituierten Amine (4-Biphenyl, 2-Fluorenyl). ^b Miteinbezogen wurden alle *ortho*-alkylierten 4-Nitrobiphenyle und alle *para*-alkylierten/ CF_3 -substituierten Nitroaromaten (4-Biphenyl, 2-Fluorenyl, 4-Stilben).

Die mangelhafte Übereinstimmung ist einerseits an den niedrigen Korrelationskoeffizienten (R) und den hohen Standardabweichungen (s), andererseits auch graphisch an der großen Streuung der Datenⁱ erkennbar. Dieses Ergebnis ist nach der Analyse aus Kapitel F und Abschnitt G.1 auf die fehlende Berücksichtigung von sterischen Faktoren zurückzuführen. Eine wesentliche Verbesserung der Vorhersagen sollte demnach dadurch möglich sein, daß man neben der Hydrophobie und den Orbitalenergien zusätzlich sterische Parameter miteinbezieht.

ⁱ Bei einer idealen Korrelation würden alle Punkte auf einer Geraden der Steigung 1 liegen.

Da die Debnath-Hansch-Gleichungen die generelle Abhängigkeit von Hydrophobie und elektronischen Faktoren für Substanzen ohne sperrige Substituenten prinzipiell aber sehr erfolgreich beschreiben, wurde hier nicht versucht, völlig neue Gleichungen zu entwickeln, sondern die bestehenden Gleichungen durch einen sterischen Term anzupassen.

Als sterische Parameter wurden dazu die E_s -Werte des Taft-Modells herangezogen, die schon in anderen QSAR-Analysen erfolgreich angewendet worden sind (siehe Abschnitt D.3.3). Obwohl E_s -Werte bereits für viele Substituenten experimentell bestimmt worden sind,⁹⁶ standen für die Derivate mit Triflat-, Benzoessäureester-, Alkoxy- und Dialkylaminosubstituenten, bei denen sterische Effekte ebenfalls wichtig zu sein scheinen, keine entsprechenden E_s -Werte zur Verfügung. Für die Ergänzung der QSAR-Gleichungen konnten daher nur die ringalkylierten und CF_3 -substituierten Amino-/Nitroaromaten berücksichtigt werden. Die entsprechenden E_s -Werte sind in Tabelle 62 zusammengefaßt.⁹⁶

Tabelle 62: Sterische Konstanten für Alkyl/ CF_3 -Substituenten

Substituent	E_s -Wert	Substituent	E_s -Wert
-H	0	-sBu	-2.37
-Me	-1.24	-CF₃	-2.40
-Et	-1.31	-tBu	-2.78
-iPr	-1.71	-Ph	-3.82 ^a
-nBu	-1.63	-Ad	-5.75 ^b

^a Für den Phenylrest gibt es zwei Parameter. Der hier Parameter verwendete basiert auf der Breite des Phenylrestes.

^b Da für den Adamantylrest kein Wert zu Verfügung stand, wurde E_s abgeschätzt.⁹⁰

Zur Beschreibung des Einflusses von sterischen Faktoren auf das mutagene Potential als $\log(\text{Rev/nmol})$ sind grundsätzlich die verschiedensten mathematischen Modelle denkbar. Für die konkrete Anpassung der Debnath-Hansch-Gleichungen wurde hier der einfachste Fall – nämlich eine lineare Abhängigkeit – angenommen. Die Gleichungen für beide Teststämme (Amino- und Nitroaromaten) wurden dazu jeweils um einen sterischen Korrekturterm der Form

$$\text{Korrekturterm} = a_1 \cdot E_{s,\text{ges}} + a_2 \quad (12)$$

ergänzt, dessen Variablen (a_1 und a_2) durch multiple, iterative Levenberg-Marquardt Regression so optimiert wurden, daß die gesamte Gleichung die experimentell bestimmten Mutagenitäten möglichst gut wiedergab.

Dabei wurde vorausgesetzt, daß sich die sterischen Effekte bei gleichzeitiger Anwesenheit von mehreren Substituenten additiv verhalten:

$$E_{s,ges} = \sum E_s^i \quad (13)$$

Für die Bestimmung des Korrekturterms für die Amine wurden die Strukturdaten und die experimentellen Mutagenitäten der *ortho*- und *para*-alkylierten bzw. CF₃-substituierten Derivate von 4-Aminobiphenyl, 2-Aminonaphthalin und 2-Aminofluoren aus den Tabellen 56, 59 und 61 herangezogen. Die Optimierung ergab folgende Gesamtgleichungen:

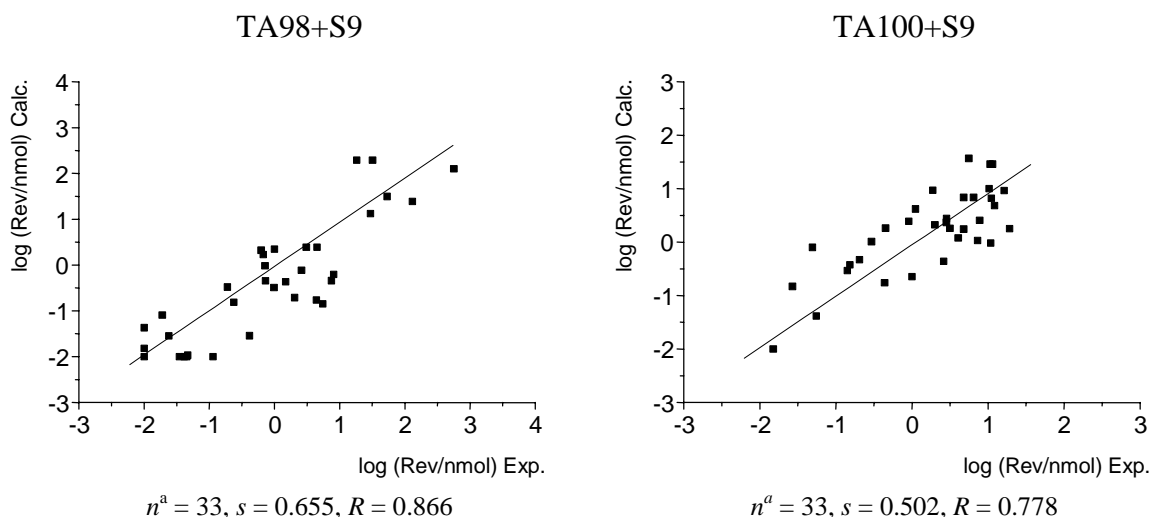
$$\begin{aligned} \log TA98 = & 1.08 \log P - 1.28 E_{HOMO} - 0.73 E_{LUMO} + 1.46 I_1 + 7.20 \\ & + 1.28(\pm 0.10) \sum E_s + 0.73(\pm 0.23) \quad n = 33, s = 0.655, R = 0.866 \quad (14) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log TA100 = & 0.92 \log P - 1.17 E_{HOMO} - 1.18 E_{LUMO} + 7.35 \\ & + 1.07(\pm 0.08) \sum E_s + 0.59(\pm 0.17) \quad n = 33, s = 0.502, R = 0.778 \quad (15) \end{aligned}$$

Die Korrelation der experimentellen Mutagenitäten mit den Vorhersagen, die auf Grundlage der neuen Gleichungen gemacht wurden, ist in Abb. 124 dargestellt.

Abb. 124: Korrelationsanalyse zwischen den verbesserten Vorhersagen und den experimentellen Daten für alkylierte/CF₃-substituierte Aminoaromaten

Aminoaromaten



^a 3,5DiMe-4ABp wurde nicht miteinbezogen.

Wie die hohen Korrelationskoeffizienten (*R*) und die niedrigen Standardabweichungen (*s*) belegen, ist dieser Ansatz tatsächlich geeignet, den sterischen Effekt von Alkyl-/CF₃-Substituenten zu beschreiben. An Abb. 124 ist zu erkennen, daß die angepaßten Gleichungen

ⁱ Für eine Verbindung wie 3,5DiEt-4NBp mit zwei Ethylresten wurde also beispielsweise ein *E*_{s,ges}-Wert von $2 \cdot -1.31 = -2.62$ angesetzt.

über den gesamten Mutagenitätsbereich anwendbar sind. Sowohl stark aktive Verbindungen wie 7Me-2AF **119** ($\log \text{Rev}_{\text{exp./TA98/nmol}} = 1.47$), als auch inaktive Verbindungen wie 3,5DiPr-4ABp **322** ($\log \text{Rev}_{\text{exp./TA98/nmol}} = -2$) werden richtig vorhergesagt. Das positive Vorzeichen von E_s in den angepaßten Gleichungen (**14**) und (**15**) besagt, daß die Mutagenität mit steigenden sterischen Anspruch linear abnimmt.ⁱ Die Koeffizienten von E_s sind zudem in beiden Gleichungen ungefähr gleich, und belegen damit, daß sterische Effekte in beiden Stämmen von Bedeutung sind.

Von den untersuchten Aminen stellte allein die Verbindung 3,5DiMe-4ABp **113** eine klare Ausnahme dar, die weder bei der Optimierung des sterischen Terms noch bei der Korrelationsanalyse miteinbezogen wurde. Aufgrund des angenommenen additiven Verhaltens der sterischen Effekte wurde 3,5DiMe-4ABp **113** mit seinen zwei Methylgruppen ein E_s -Wert von -2.48 zugeordnet, der fast an den E_s -Wert des *tert*-Butylsubstituenten heranreicht. Tatsächlich ist **113** aber wesentlich mutagener als es ein solch hoher E_s -Wert vermuten ließe. Für die Beschreibung der sterischen Effekte von Methylsubstituenten bei aromatischen Aminen (+S9) ist die Addition der E_s -Werte offensichtlich ein ungeeignetes Verfahren. Der Grund für die starke Abweichung liegt darin, daß Methylsubstituenten in Gegenwart von S9-Mix auch selbst aktiviert werden können (vgl. F.4). Durch Verwendung anderer Methoden zur Bestimmung von $E_{s,\text{ges}}$ oder durch Verwendung komplexerer Korrekturterme (z.B. kurzer Polynomreihen: $a_1 \cdot E_s + a_2 \cdot E_s^2 + a_3$), die es erlauben, die Aktivierung kleiner Substituenten wie Methyl zu berücksichtigen, konnten tatsächlich noch bessere Korrelationen erhalten werden. Da der direkte Aussagewert solcher Terme aber weniger leicht ersichtlich ist und die statistische Signifikanz sinkt, soll hier auf die Angabe der weiteren Gleichungen verzichtet werden.

Nach demselben Verfahren wie oben wurden auch die sterischen Korrekturterme für die Nitroverbindungen bestimmt. Im Gegensatz zu den Aminen konnten für die Entwicklung der Gleichungen aber nur Verbindungen mit $\log P < 6$ miteinbezogen werden, bei denen nach den Original-Gleichungen die Mutagenität mit der Hydrophobie ansteigt. Wie die Analyse von Debnath und Hansch gezeigt hat, führt ein weiterer Anstieg der Hydrophobie über den optimalen $\log P$ -Wert hinaus wieder zu einer linearen Abnahme der Mutagenität. Bei Alkylsubstituierten Nitroverbindungen mit $\log P$ -Werten > 6 kann daher nicht eindeutig entschieden werden, ob die Mutagenitätsabnahme durch die Hydrophobie oder den sterischen Anspruch des Alkylsubstituenten verursacht wird. Für die Optimierung des Korrekturterms standen aber mit bis zu 29 *ortho*- und *para*-alkylierten bzw. CF_3 -substituierten Derivaten von

ⁱ Die E_s -Werte selbst sind negativ.

4-Nitrobiphenyl, 2-Nitrofluoren, 5-Phenyl-2-nitropyridin, 2-Phenyl-5-nitropyridin und 4-Nitrostilben aus den Tabellen 57, 58, 60 und 61 genügend Daten zur Verfügung. Folgende Gleichungen wurden erhalten:

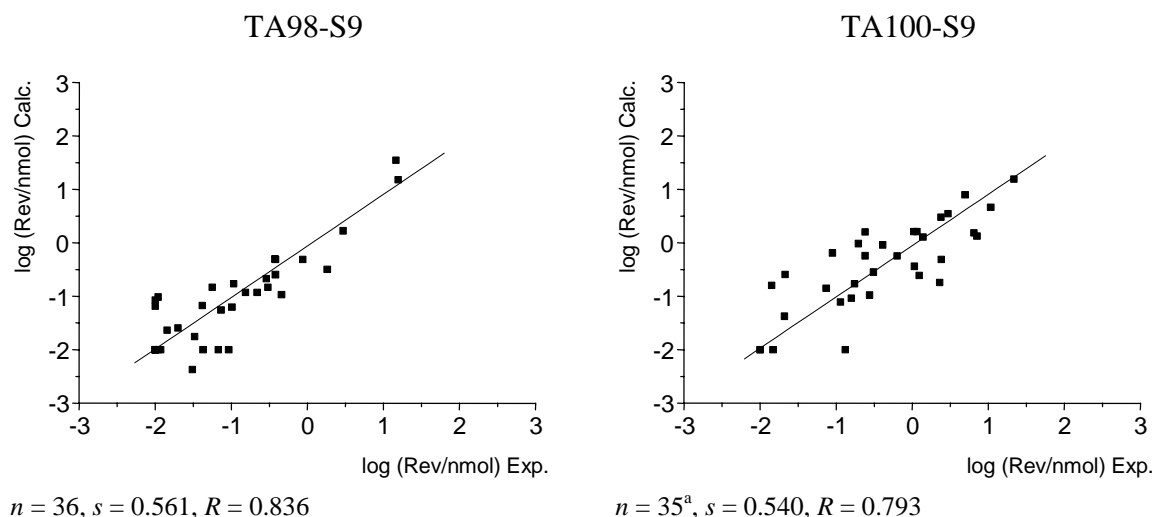
$$\begin{aligned} \log \text{TA98} = & 0.65 \log P - 2.90 \log (\beta 10^{\log P} + 1) - 1.38 E_{\text{LUMO}} + 1.88 I_1 - 4.15 \\ & + 0.73(\pm 0.09) \Sigma E_s - 0.16(\pm 0.17) \quad n = 30, s = 0.481, R = 0.867 \quad (16) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log \text{TA100} = & 1.20 \log P - 3.40 \log (\beta 10^{\log P} + 1) - 2.05 E_{\text{LUMO}} - 6.39 \\ & + 0.96(\pm 0.12) \Sigma E_s - 0.11(\pm 0.23) \quad n = 29, s = 0.420, R = 0.780 \quad (17) \end{aligned}$$

Bei den Nitroaromaten wurde durch diese Anpassung ebenfalls eine gute Übereinstimmung zwischen den experimentellen und den (neu) vorhergesagten Mutagenitäten erreicht. Die verbesserten Gleichungen können auch herangezogen werden, um das mutagene Potential der Verbindungen mit $\log P > 6$ zu berechnen. Bezieht man alle untersuchten Nitroaromaten mit ein, ergibt sich die in Abb. 125 dargestellte Korrelation.

Abb. 125: Korrelationsanalyse zwischen den verbesserten Vorhersagen und den experimentellen Daten für alkylierte/ CF_3 -substituierte Nitroaromaten

Nitroaromaten



^a Nicht miteinbezogen wurde 4iPr-4NBp.

Fazit: Die QSAR-Gleichungen von Debnath und Hansch können mit Hilfe eines Korrekturterms entscheidend verbessert werden. Durch Berücksichtigung eines sterischen Terms können auch sterische Einflüsse von großen Substituenten richtig vorhergesagt werden.

H Zusammenfassung und Ausblick

Einleitung und Aufgabenstellung (s. Kapitel A, B, C, D)

Amino- und Nitroaromaten haben im Labor und in der Industrie als Ausgangsmaterialien für die Synthese von Farbstoffen, Kunststoffen, Medikamenten und zahlreichen anders genutzten Verbindungen eine enorme Bedeutung. Aus toxikologischer Sicht sind Amino- und Nitroaromaten allerdings höchst bedenklich, da sich viele Vertreter dieser Verbindungsklassen als krebserregend (kanzerogen) und genotoxisch (mutagen) erwiesen haben. Besonders hoch ist das Gesundheitsrisiko für Arbeitnehmer, die aus beruflichen Gründen mit größeren Mengen solcher Substanzen umgehen. Da ein vollständiger Verzicht auf Amino- und Nitroaromaten in Industrie und Forschung weder sinnvoll noch möglich ist, werden Ersatzstoffe benötigt, die keine kanzerogenen/mutagenen Eigenschaften mehr haben und damit die Gefahren für Mensch und Umwelt verringern (s. Kapitel 0).

Verantwortlich für die Genotoxizität von Amino- und Nitroaromaten ist ihre metabolische Aktivierung im Körper zu elektrophilen Folgeprodukten (Hydroxylamine \rightarrow reaktive Ester \rightarrow Nitreniumionen). Diese können mit den nukleophilen Basen Guanosin und Adenosin reagieren und auf diese Weise mit der DNA kovalente Addukte bilden (s. Kapitel B). Werden die Addukte nicht durch Reparaturprozesse entfernt, kommt es bei der Replikation zu Fehlern. Solche Mutationen sind die molekulare Ursache für die Entstehung von Krebs.

Die Mutagenität von Amino- und Nitroaromaten kann durch Genotoxizitätsassays wie dem Ames-Test (*Salmonella typhimurium* TA98 \pm S9 und TA100 \pm S9) heute innerhalb weniger Tage zuverlässig ermittelt werden (s. Kapitel C). Die Aktivität dieser Verbindungen ist dabei in Abhängigkeit von der Struktur des aromatischen Grundkörpers sehr unterschiedlich. Aus quantitativen Struktur-Mutagenitäts-Untersuchungen (QSAR) geht hervor, daß das mutagene Potential durch die Größe des aromatischen Systems (Anzahl der kondensierten Ringe), durch elektronische Faktoren (z.B. Orbitalenergien) und vor allem durch die Hydrophobie (log P) bestimmt wird. Debnath und Hansch haben empirische Gleichungen entwickelt, mit denen das mutagene Potential von Amino- und Nitroaromaten allein auf Grundlage von log P-Werten und Orbitalenergien vorhergesagt werden kann (s. Kapitel D).

In dieser Arbeit wurde anhand von Modellverbindungen untersucht, wie sich strukturelle Modifikationen durch Einführung von Substituenten an das aromatische Grundgerüst (z.T. auch an die Aminogruppe) auf die Mutagenität auswirken. Im Vordergrund stand die Frage, auf welche Weise genotoxische Amino- und Nitroaromaten verändert werden müssen, um ihr

mutagenes Potential und ihre kanzerogenen Eigenschaften zu verringern. Literaturstudien und Untersuchungen aus unserem eigenen Arbeitskreis haben gezeigt, daß große Alkylreste (z.B. *tert*-Butyl) in *ortho*-Position zur Amino- oder Nitrogruppe zu einem Rückgang der Mutagenität führen. In der vorangegangenen Diplomarbeit hatten sich erste Hinweise ergeben, daß raumfüllende Substituenten auch an anderen Positionen weit entfernt von der funktionellen Gruppe die Mutagenität reduzieren. Unklar war, ob es sich hier um einen allgemeinen Effekt handelt. In 2D-QSAR-Studien über Struktur-Mutagenitäts-Beziehungen von Amino- und Nitroaromaten wurden sterische Faktoren bisher nicht berücksichtigt.

Insgesamt wurden etwa 70 Derivate von den bekanntermaßen mutagenen Grundkörpern 4-Nitrobiphenyl **1**, 4-Aminobiphenyl **2**, 2-Nitrofluoren **3**, 2-Aminofluoren **4** und 4-Nitrostilben **5** sowie von den heteroaromatischen Verbindungen 2-Phenyl-5-nitropyridin **104**, 2-Phenyl-5-aminopyridin **106** und 5-Phenyl-2-nitropyridin **117** synthetisiert und im Ames-Test untersucht. Die Derivate umfassen dabei hauptsächlich Modifikationen mit Alkyl-, aber auch mit CF₃-, Alkoxy- und N,N-Dialkylaminosubstituenten.

Synthesen (s. Kapitel E)

Die Synthese der Testsubstanzen erfolgte überwiegend durch Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen. Basierend auf dem Standard-Suzuki-Protokoll wurde ein "Eintopf-Verfahren" ausgearbeitet, das die gewünschten Alkyl-substituierten 4-Nitrobiphenyle generell in hohen Ausbeuten liefert. Dieses Verfahren ist effizienter als die Suzuki-Reaktion, da hierbei die benötigten Boronsäuren *in situ* erzeugt werden und daher nicht isoliert werden müssen. Zur Herstellung der CF₃-, Alkoxy- und N,N-Dialkylamino-substituierten Derivate war die Negishi-Reaktion, bei der unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet wird, allerdings besser geeignet. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen und der Palladiumliganden ergaben die Kupplungsreaktionen, auch bei deutlich geringeren Katalysatorkonzentrationen als in der Literatur angegeben, gute Ausbeuten (s. E.2). Die Negishi-Kupplung diente ebenfalls als Schlüsselschritt für die Entwicklung einer neuen regioselektiven Darstellungsmethode für substituierte 2-Nitrofluorene. Durch eine Synthesesequenz aus Kupplung von substituierten Zinkarylen mit 2-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester, chemoselektiver Reduktion der Estergruppe und säurekatalysiertem Ringschluß konnten die entsprechenden 2-Nitrofluorene isomerenrein in hohen Ausbeuten dargestellt werden (s. E.3). Die heteroaromatischen Verbindungen waren durch Kreuzkupplungen (s. E.4) und die Nitrostilbene durch Wittig-Horner-Reaktion zugänglich (s. E.5). Die benötigten Amine wurden im wesentlichen aus den entsprechenden Nitroaromaten durch Reduktion synthetisiert.

Struktur-Mutagenitäts-Untersuchungen (s. Kapitel F)

Die Mutagenitätsuntersuchungen ergaben, daß die Aktivität im Ames-Test durch zusätzliche Substituenten in weiten Grenzen variiert werden kann. Die beobachteten Effekte reichten von einer Vervielfachung bis zur Auslöschung der Mutagenität. Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Einführung kleiner Alkylsubstituenten (Methyl, Ethyl) führte bei allen Amino- und Nitroaromaten zu einer Erhöhung der Mutagenität (s. F.2, F.3). Dieser Effekt ist unter anderem darauf zurückzuführen, daß Alkyl-substituierte Aromaten in Gegenwart des metabolischen Aktivierungssystems (S9-Mix) in der Benzylposition oxidativ aktiviert werden können. Dies konnte durch Untersuchungen an den potentiellen Metaboliten (Benzylalkohole, Carbonsäuren) eindeutig belegt werden (s. F.4).

Sterisch anspruchsvollere Alkylsubstituenten bewirkten dagegen einen Rückgang der Mutagenität. Die Verminderung der Mutagenität war dabei mit dem Raumbedarf der Substituenten korreliert. Durch Einführung von sterisch anspruchsvollen Alkylgruppen (*iso*-Propyl, *tert*-Butyl, Adamantyl) konnten die stark mutagenen Amino- und Nitroaromaten 4NBp **1**, 4ABp **2**, 2NF **3**, 2AF **4**, 4NS **5** und 2Ph5NP **104**, 5Ph2NP **106**, 5Ph2AP **117** in weitaus weniger mutagene oder inaktive Derivate überführt werden (s. F.3). Die mutagenitätsverringende Wirkung von Alkylgruppen trat in beiden Teststämmen (TA98 und TA100) sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit des S9-Mix auf und war in TA98 in der Regel stärker ausgeprägt als in TA100. Eine Ausnahme von diesem generellen Effekt wurde nur bei den alkylierten 4-Nitrostilbenen in Gegenwart von S9-Mix beobachtet. Bei diesen Verbindungen bewirkte der S9-Mix eine außergewöhnlich starke Aktivierung der Alkylgruppen, so daß sterische Effekte in den Hintergrund traten (s. F.6).

Der Grund für die starke Mutagenitätsreduktion liegt darin, daß durch die Einführung der großen Alkylreste die Molekülgestalt insgesamt deutlich verändert wird. Einerseits können die ursprünglich planaren Aromaten aufgrund der raumfüllenden Substituenten nicht mehr effizient zwischen die DNA-Basen interkalieren und somit nicht mehr als Frameshift-Mutagene wirken. Ein anderer Erklärungsansatz beruht auf dem Einfluß der Adduktbildung auf die konformative Heterogenität der DNA. Vermutlich begünstigen sterisch anspruchsvolle Substituenten solche Konformationen ("B-type"), die selten oder nie zu Mutationen führen. Die dreidimensionale Struktur der Addukt-modifizierten DNA ist hierbei im Vergleich zur nicht modifizierten DNA nur wenig gestört. Vergleichende Konformationsanalysen an DNA-Oligomeren mit Addukten von 2-AF **4**, 4-ABp **2** und 4*t*Bu-4ABp **116** durch Kraftfeldrech-

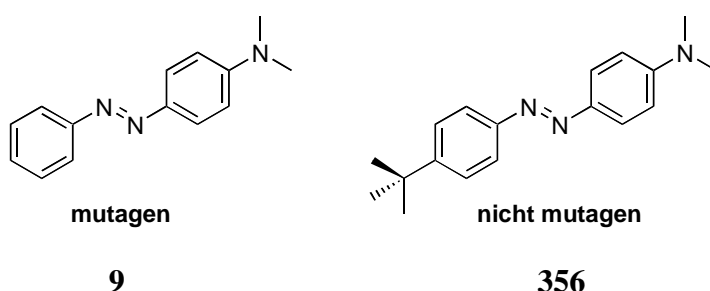
nungen unterstützen diese These. Einen klaren Beweis sollten zukünftige NMR-Studien an entsprechend modifizierten DNA-Oligomeren liefern.

Außer den großen Alkylgruppen führten auch andere Substituenten wie die metabolisch inaktiven CF₃-Gruppen zu einer Reduktion der Mutagenität (s. F.5). Die Einführung von Methoxy- und Ethoxysubstituenten hatte dagegen einen extremen Anstieg der Mutagenität zur Folge. 4'-Methoxy-4-nitrobiphenyl **140**, 4'-Methoxy-4-aminobiphenyl **151** und 4'-Methoxy-2-phenyl-5-nitropyridin **144** waren sehr viel stärker mutagen als ihre unsubstituierten Grundkörper. Die Mutagenitätsverstärkung hängt wahrscheinlich mit der Stabilisierung der intermediär auftretenden Nitreniumionen zusammen. Durch Einführung einer *tert*-Butylgruppe an den Ring oder durch Austausch der kleinen Alkylreste gegen *tert*-Butyl-, *n*-Octyl- oder Adamantylgruppen konnten jedoch auch diese hochaktiven Alkoxyverbindungen in inaktive Derivate überführt werden (s. F.8). Ein ganz ähnlicher Trend wurde bei den N,N-Dialkylaminosubstituierten Verbindungen beobachtet. Während eine N,N-Dimethylaminogruppe die Mutagenität im Vergleich zum Grundkörper insgesamt erhöhte, bewirkte die wesentlich größere N,N-Di-*iso*-propylaminogruppe einen deutlichen Aktivitätsrückgang (s. F.7). Die Mutagenitätsdaten in Gegenwart von S9-Mix zeigten außerdem, daß kleine, an Heteroatome (Sauerstoff, Stickstoff) gebundene Alkylgruppen oxidativ leicht abgespalten werden (s. F.1, F.7, F.8). Bei großen Resten ist dieser Abbau wesentlich langsamer.

Fazit: Die Mutagenitätsuntersuchungen belegen, daß sterisch anspruchsvolle Substituenten (Alkyl-, Alkoxy- oder N,N-Dialkylaminosubstituenten) unabhängig von ihrer speziellen Struktur generell zu einer Reduktion oder Auslöschung der Mutagenität führen. Dieser Effekt konnte bei verschiedenen aromatischen und heteroaromatischen Amino- und Nitroverbindungen nachgewiesen werden. Gegenüber ihren *ortho*-substituierten Analoga hat die Einführung von *para*-Substituenten den Vorteil, daß diese wegen der großen räumlichen Distanz die Eigenschaften der funktionellen Gruppen nicht ungünstig beeinflussen können. Die funktionellen Gruppen bleiben genauso leicht chemisch modifizierbar wie bei den unsubstituierten Grundkörpern. Die Einführung von großen Substituenten ist damit eine allgemein anwendbare Methode zur Herstellung von nicht-mutagenen Ersatzstoffen für Amino- und Nitroaromaten.

Mittlerweile wurde diese Strategie in unserem Arbeitskreis erstmalig auch auf ein kommerziell interessantes Produkt angewendet. So zeigen neueste Untersuchungen, daß der mutagene Azofarbstoff N,N-Dimethylaminoazobenzol **9** (Buttergelb) durch Einführung eines *tert*-Butylsubstituenten in die nicht-mutagene Verbindung **356** überführt werden kann.

Abb. 126: Ein nicht-mutagener Ersatzstoff für Buttergelb



In zukünftigen Arbeiten sollte dieses Konzept auf weitere Verbindungen übertragen werden. Interessant wäre beispielsweise die Modifikation der mutagenen Aristolochiasäure durch sterisch anspruchsvolle Substituenten.

QSAR-Analysen (s. Kapitel G)

Durch die Einführung von zusätzlichen Substituenten werden neben dem sterischen Anspruch auch die Hydrophobie und die Orbitalenergien eines gegebenen Grundkörpers beeinflusst. Alle diese Faktoren wirken sich auf die Mutagenität aus. Zur Untersuchung, inwieweit die bestehenden QSAR-Gleichungen geeignet sind, den Mutagenitätsrückgang durch raumfüllende Substituenten korrekt zu erfassen, wurden die experimentellen Mutagenitäten der getesteten Modellsubstanzen mit den Vorhersagen auf Grundlage der Debnath-Hansch-Gleichungen ausführlich verglichen. Dabei zeigte sich, daß nur die Aktivitäten der Grundkörper und der Derivate mit kleinen Substituenten (z.B. Methyl) weitgehend richtig wiedergegeben wurden. Bei den Derivaten mit größeren Substituenten (*iso*-Propyl, *tert*-Butyl, Adamantyl) stiegen die Unterschiede zwischen Vorhersage und Experiment mit zunehmender Größe der Substituenten an. Verbindungen wie 4'*t*Bu-4NBp **97**, 4'*t*Bu-4ABp **116**, 4'*t*Bu-2Ph5NP **104**, 4'*t*Bu-5Ph2NP **106**, 4'*t*Bu-5Ph2AP **118**, 7*t*Bu-2NF **109** und 7*t*Bu-2AF **120** sollten nach den Debnath-Hansch-Gleichungen hochgradig mutagen sein, tatsächlich waren diese Substanzen aber nur sehr schwach mutagen oder inaktiv. Die Gleichungen, in denen sterische Faktoren nicht berücksichtigt werden, sind in ihrer ursprünglichen Form also völlig ungeeignet, den Einfluß von raumfüllenden Substituenten auch nur näherungsweise richtig vorherzusagen (s. G.1).

Die in dieser Arbeit ermittelten Mutagenitätsdaten ermöglichten es, die Debnath-Hansch-Gleichungen so zu verbessern, daß auch der Einfluß von solchen Substituenten berücksichtigt werden konnte. Dies gelang durch die Einführung eines zusätzlichen linearen Terms, in dem E_s -Werte (nach der Definition von Taft) als sterische Parameter benutzt wurden. Durch Optimierung der Variablen des Korrekturterms konnte dieser Ansatz auf *ortho*- und *para*-alkylierte Amino- und Nitroaromaten erfolgreich angewendet werden (s. G.2). Diese erweiter-

ten Gleichungen ermöglichen es, die Mutagenität von beliebigen Amino- und Nitroaromaten mit Alkylsubstituenten oder CF_3 -Gruppen unabhängig von der Position des Substituenten in TA98 und TA100 (aromatische Amine: +S9, Nitroaromaten: -S9) richtig vorherzusagen. Das Anwendungspotential der QSAR-Vorhersagen wird dadurch enorm erweitert. In zukünftigen Studien sollten bei der Optimierung des sterischen Terms auch Alkoxy- und N,N-Dimethylaminosubstituenten miteinbezogen werden, für die zur Zeit noch keine E_s -Werte zur Verfügung stehen.

I Experimenteller Teil

I.1 Computermethoden

I.1.1 Strukturparameter für QSAR-Rechnungen

AM1 Strukturoptimierung: Die Startgeometrien für alle Verbindungen wurden entweder durch MM2 Kraftfeldrechnungen oder aus entsprechenden Strukturen mit Standard Bindungslängen und Bindungswinkeln erzeugt. Die Nitro- bzw. Aminogruppe wurde dabei jeweils planar zum aromatischen Gerüst angeordnet; bei den Biphenylderivaten wurde der Diederwinkel zwischen den beiden Phenylringen auf 45° eingestellt.ⁱ Der Konformationsraum für die Ethyl-, *iso*-Propyl- und *n*-Butyl-substituierten Verbindungen wurde vollständig abgesucht, indem die Diederwinkel zwischen der Alkylgruppe und der aromatischen Ebene in 30°-Schritten verändert wurden. Die vollständige Geometrieoptimierung wurde nach der AM1-Methode von Dewar²³⁷ mit den Programmen CS Chem3D Pro 3.5 und MOPAC V. 6.0 durchgeführt. Als 'key words' wurden EF GNORM=0.040 GEO-OK AM1 XYZ PRECISE LET DDMIN=0.0 verwendet.

Alle Strukturparameter wie Diederwinkel wurden den geometrieoptimierten Konformeren mit der niedrigsten Bildungsenthalpie entnommen. Das gleiche gilt für LUMO und HOMO Energien (E_{LUMO} , E_{HOMO} , in eV), die dem MOPAC-Output entnommen wurden.

Die log P Koeffizienten wurden für alle Verbindungen mit dem Programm KOWWIN V. 1.65 berechnet. Die so berechneten log P-Werte stimmen mit den experimentellen Daten gut (± 0.2 Einheiten) überein.

I.1.2 Macromodel Konformationsanalysen

Die Konformationsanalysen erfolgten mit dem Programmpaket Macromodel V. 6.0 auf einer SGI-Workstation Indigo II mit einem R10.000-Prozessor. Für die Energieminimierungen wurde das Amberkraftfeld verwendet. Das Lösungsmittel Wasser wurde durch ein dielektrisches Feld simuliert. Der Aufbau des Decamers in Standard-B-DNA-Geometrie und die Aduktmodifikation erfolgte über den "Grow"-Mechanismus von Macromodel.

ⁱ Versuche ergaben, daß immer derselbe Diederwinkel gefunden wird, unabhängig davon ob der Startwinkel größer als 45° oder kleiner als 45° war.

Für jedes der Addukt-modifizierte Oligomere wurde durch Veränderung der Diederwinkel (z.B. zwischen Zucker und Base, Base und Addukt, Nukleotid und Phosphateinheit) ein umfangreicher Satz von Startgeometrien erzeugt, wobei im besonderen solche Konformationen berücksichtigt wurden, die sich in vergleichbaren Studien als günstig erwiesen haben. Dabei wurden auch die dem Desoxyguanosin benachbarten und gegenüberliegenden Nukleotide miteinbezogen. Nach Energie-Minimierung (maximal 5000 Iterationen) wurden die erhaltenen Konformere für Moleküldynamik-Simulationen (500 ps, SHAKE-Algorithmus) eingesetzt. Diese lieferten jeweils einen neuen Satz von 100 Konformationen, die erneut minimiert wurden und danach bereits bedeutend stabiler waren als die minimierten Startgeometrien. Aus diesem Satz wurden weitere energiearme, strukturell unterschiedliche Konformere ausgewählt, erneut Moleküldynamik-Simulationen durchgeführt und wieder minimiert. Ein weiterer Zyklus ergab aber keine bedeutend energieärmeren neuen Konformationen.

I.2 *Synthesen und Experimente*

I.2.1 Geräte, Chemikalien, Methoden

I.2.1.1 Lösungsmittel und Chemikalien

Die für Synthesezwecke verwendeten Lösungsmittel wurden nach den folgenden Standardmethoden gereinigt und getrocknet.

Tetrahydrofuran wurde über Kaliumhydroxid vorgetrocknet und anschließend mehrere Tage mit einer Kalium-Natrium-Legierung refluxiert. Diethylether wurde über Calciumchlorid vorgetrocknet und über Natrium unter Rückfluß gekocht. Dimethoxyethan wurde destilliert und dreimal entgast. Das für Kupplungsreaktionen verwendete Wasser wurde zweifach destilliert und durch Argoneinleitung im Ultraschallbad von Sauerstoff befreit.

Lösungsmittel für die Produktreinigung (Umkristallisieren, Säulenchromatographie) und analytische Verfahren wurden nur nach destillativer Reinigung am Rotationsverdampfer eingesetzt. Deuterierte Lösungsmittel wie Chloroform, Dichlormethan oder D₂O wurden wie erhalten verwendet, deuteriertes Dimethylsulfoxid vor Gebrauch über Molsieb getrocknet.

Ausgangskemikalien wurden entweder vom Fachbereich zur Verfügung gestellt, im Chemikalienhandel (Aldrich, Lancaster) erworben oder nach den angegebenen Vorschriften synthetisiert. Die Reinigung erfolgte gegebenenfalls nach Standardmethoden. Zinkchlorid für die

Transmetallierung (in einen Stickstoffkolben eingewogen mit 2 % Überschuß) wurde vor Verwendung durch vorsichtiges Erwärmen im Vakuum getrocknet bis ein feines Pulver entstanden war. Der Gehalt von *tert*-Butyllithiumlösungen wurde durch Gilmann-Doppeltitration bestimmt.²³⁸

I.2.1.2 Präparative Reinigungsmethoden

Für Trennungen von Produktgemischen durch Flashchromatographie wurde Kieselgel 60 der Firma Merck (Korngröße 0.063 - 0.200 mesh ASTM) bzw. Flashgel 60 der Firma Fluka verwendet. Kieselgelmengen und Säulenparameter richteten sich weitgehend nach den Empfehlungen von Still.²³⁹

Trennungen durch präparative HPLC erfolgten an den Geräten von Merck-Hitachi (L-6200 Intelligent Pump, L-4000 UV-Detektor und D-2500 Chromato-Integrator) entweder an einer Reversed Phase Säule (RP18) mit einer Methanol-Wasser-Mischungen als Laufmittel oder an einer Normalphasensäule mit Essigsäureethylester-Petrolether-Mischungen.

I.2.1.3 Analytische Methoden und Geräte

Dünnschichtchromatographische Analysen (DC) wurden mit DC-Alufolien 5 · 10 cm, Kieselgel 60 F₂₅₄ mit Fluoreszenzindikator der Firma Merck durchgeführt. Die Substanzdetektion erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) oder durch Anfärbung der Chromatogramme mit einer Molybdophosphorsäurelösung bzw. Kaliumpermanganatlösung und anschließender Erwärmung mit dem Heißluftfön. Gaschromatographische Analysen erfolgten mit einem Siemens MX-Gerät oder wurden von der massenspektroskopischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg aufgenommen (GC-MS).

NMR-Spektren wurden an den Spektrometern ARX-200, AC-300 oder DRX-400 der Firma Bruker Physics mit voreingestellten Pulsprogrammen (MRP, MRC, MBC, MWC) aufgenommen. Chemische Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf den Referenzstandard Tetramethylsilan ($\delta = 0$). Lösungsmittelsignale wurde in ¹H-Spektren und ¹³C-Spektren auf die in der Literatur angegebenen Werte kalibriert (¹H-NMR: $\delta_{\text{Chloroform}} = 7.24$, $\delta_{\text{THF}} = 3.58$, $\delta_{\text{DCM}} = 5.32$, $\delta_{\text{DMSO}} = 2.49$; ¹³C-NMR: $\delta_{\text{Chloroform}} = 77.0$, $\delta_{\text{THF}} = 67.7$, $\delta_{\text{DCM}} = 53.5$, $\delta_{\text{DMSO}} = 39.7$).²⁴⁰ Zur Beschreibung der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), pen (Pentett), sex (Sextett), sep

(Septett), m (Multiplett), br (breites Signal), Ψ (pseudo, z.B. Ψ_t , meint ein Multiplett, das wie ein breites Triplet aussieht).

Massenspektren (MS, Elektronenstoßionisation, 70 eV, Varian MAT CH 7A) und hochauflösende Massenspektren (HRMS) wurden in der massenspektroskopischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg aufgenommen. Die angegebenen relativen Peakintensitäten beziehen sich auf den Basispeak (100 %).

CHN-Analysen wurden von der analytischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg mit einem Heraeus-Rapid-Elementaranalysator durchgeführt.

Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktmeßgerät nach Dr. Tottoli der Firma Büchi bestimmt. Die angegebenen Temperaturen sind nicht korrigiert.

I.2.1.4 Allgemeines

Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Stoffen wurden grundsätzlich in ausgeheizten Glasapparaturen unter Argon-Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Verwendete Spritzen, Kanülen und Transfernadeln wurden vor Gebrauch mit Inertgas gespült.

Viele aromatische Amine und Nitroverbindungen sind im Ames-Test mutagen und damit wahrscheinlich auch kanzerogen. Beim Umgang mit solchen Verbindungen muß mit Handschuhen und Schutzkleidung in einem gut ziehenden Abzug gearbeitet werden.

Einige der dargestellten aromatischen Amine, insbesondere die elektronenreichen, sind licht- und luftempfindlich. Beim Einengen von Lösungen dieser Amine am Rotationsverdampfer sollte man unter Lichtschutz arbeiten und mit Argon belüften. Verbindungen, die im Ames-Test untersucht werden sollten, wurden unter Argon bei -20 °C gelagert.

Alle Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals dargestellt worden sind, wurden durch ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS und HRMS oder CHN-Analyse charakterisiert. Fehlende analytische Daten von literaturbekannten Präparaten wurden hier gegebenenfalls ergänzt, ansonsten sind nur ^1H -NMR Daten angegeben.

Aus Platzgründen wurden nicht alle Reaktionen und Experimente, die im Hauptteil erwähnt sind, im experimentellen Teil beschrieben. Weggelassen wurden alle Umsetzungen, die nicht zum gewünschten Produkt führten bzw. bei denen das Produkt nicht rein isoliert werden konnte, sowie die Kupplungen zur Ausbeuteoptimierung, bei denen nur Katalysator, Tempe-

ratur, Kupplungsdauer sowie in einigen Fällen das Arylhalogenid (Iodid statt Bromid) verändert wurden.

I.2.2 4-Nitrobiphenyle und 4-Aminobiphenyle mit Alkyl- und CF₃-Substituenten

I.2.2.1 4'-Methyl-4-nitrobiphenyl **94 (TAV: Suzuki-Kupplung)**

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an ein Verfahren von Watanabe und Suzuki.¹²⁹

In einem Dreihalskolben (Argoneinlaß, Rückflußkühler, Septum) wurde unter Argon eine Mischung von 1.51 g 4-Methylphenylboronsäure (11.0 mmol), 2.02 g 4-Bromnitrobenzol (10.0 mmol), 4.73 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (15.0 mmol) und 0.230 g Pd(PPh₃)₄ⁱ (2 mol %) in 10 ml entgastem Wasser und 60 ml entgastem DME solange (meist 20 Stunden) auf 80 °C erhitzt bis die DC-Kontrolle kein 4-Bromnitrobenzol mehr zeigte.ⁱⁱ Nach dem Abkühlen goß man die Reaktionsmischung auf Ether (Scheidetrichter), wusch mit Wasser (eventuell Ansäuern) und gesättigter Natriumchloridlösung, trocknete über MgSO₄ und entfernte das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Die Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 7:1) ergab 1.72 g 4'-Methyl-4-nitrobiphenyl **94** (81 %).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 142 °C, Lit.²⁴¹ 140 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 8.26 (d, 2 H, ³J = 8.9 Hz, H_{arom}), 7.71 (d, 2 H, ³J = 8.9 Hz, H_{arom}), 7.51 (d, 2 H, ³J = 8.2 Hz, H_{arom}), 7.29 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, H_{arom}), 2.42 (s, 3 H, -CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ = 147.5, 146.5, 139.0, 135.0, 129.8, 127.4, 127.1, 124.0, 21.1.

MS (70 eV): m/z (%) = 213 (M⁺, 100), 165 (42), 152 (M⁺ -NO₂ - CH₃, 65).

CHN-Analyse: Theorie C 73.23 %, H 5.20 %, N 6.57 %, gefunden C 73.35 %, H 5.14 %, N 6.52 %.

I.2.2.2 4'-Ethyl-4-nitrobiphenyl **95**

Die Darstellung erfolgte nach TAV I.2.2.1 durch Kupplung von 2.00 g 4-Ethylphenylboronsäure (13.3 mmol) mit 2.45 g 4-Bromnitrobenzol (12.1 mmol), 5.74 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (18.2 mmol) und 0.130 g Pd(PPh₃)₄ in 75 ml entgastem DME und 13 ml Wasser. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 7:1) ergab 2.95 g 4'-Ethyl-4-nitrobiphenyl **95** (92 %).

Analytik: schwach gelbe Kristalle, Fp. 84 °C.

ⁱ Dieser Komplex ist licht- und luftempfindlich. Unter Argon bei -20 °C lagern.

ⁱⁱ 4-Bromnitrobenzol muß vollständig umgesetzt werden, da die Abtrennung vom Produkt häufig schwierig ist.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 8.26 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.72 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.54 (d, 3J = 8.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.32 (d, 3J = 8.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 2.72 (q, 3J = 7.5 Hz, $-\text{CH}_2$, 2 H), 1.28 (t, 3J = 7.5 Hz, 3 H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz) δ = 147.5, 146.7, 145.3, 136.0, 128.6, 127.4, 127.2, 124.0, 28.5, 15.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 227 (M^+ , 90), 212 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 100), 165 (43), 152 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2 - \text{CH}_3$, 25).

CHN-Analyse: Theorie C 73.99 %, H 5.77 %, N 6.16 %, gefunden C 73.97 %, H 5.61 %, N 6.18 %.

1.2.2.3 4'-*iso*-Propyl-4-nitrobiphenyl **96** (TAV: Eintopf-Verfahren)

In einem Dreihalskolben (Argoneinlaß, Rückflußkühler, Septum) wurden unter Argon zu einer Lösung von 3.50 g 1-Brom-4-*iso*-propylbenzol (17.6 mmol) in 35 ml THF vorsichtig mit der Spritze 19.4 mmol *n*BuLi (1.6 M in Hexan, Gehalt bestimmen) bei -78°C zugegeben. Nach 1 Stunde wurden 3.64 g Tri-*iso*-propylborat (19.4 mmol) und 20 ml THF zugegeben, 30 Minuten bei -78°C gerührt, das Kältebad entfernt und 2 Stunden bei RT nachgerührt. Man gab 3.23 g 4-Bromnitrobenzol (16.0 mmol), 7.60 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (24.1 mmol), 0.170 g $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4^{\text{i}}$ (2 mol %), 10 ml entgastes Wasser und 15 ml entgastes DME zu und erhitze solange auf 80°C bis die DC-Kontrolle kein 4-Bromnitrobenzol mehr zeigte.ⁱⁱ Nach dem Abkühlen goß man die Reaktionsmischung auf Ether (Scheidetrichter), wusch mit Wasser (eventuell Ansäuern) und gesättigter Natriumchloridlösung, trocknete über MgSO_4 und entfernte das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Die Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 7:1) ergab 3.15 g 4'-*iso*-Propyl-4-nitrobiphenyl **96** (91 %). Eine Probe wurde für den Ames-Test noch zweimal aus *n*-Hexan umkristallisiert.

Analytik: schwach gelbe Kristalle, Fp. $83\text{--}84^\circ\text{C}$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.26 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.71 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.55 (d, 3J = 8.3 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.34 (d, 3J = 8.3 Hz, 2 H, H_{arom}), 2.97 (sept, 3J = 6.9 Hz, 1 H, $-\text{CH}$), 1.29 (d, 3J = 6.9 Hz, 6 H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 150.0, 147.6, 146.9, 136.2, 127.5, 127.3, 127.2, 124.0, 33.9, 23.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 241 (M^+ , 36), 226 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 100), 180 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2 - \text{CH}_3$, 39), 165 ($180 - \text{CH}_3$, 24).

CHN-Analyse: Theorie C 74.67 %, H 6.27 %, N 5.81 %, gefunden C 74.44 %, H 5.85 %, N 5.99 %.

ⁱ Dieser Komplex ist licht- und luftempfindlich. Unter Argon bei -20°C lagern.

ⁱⁱ 4-Bromnitrobenzol muß vollständig umgesetzt werden, da die Abtrennung vom Produkt häufig schwierig ist.

I.2.2.4 4'-tert-Butyl-4-nitrobiphenyl 97

Nach TAV I.2.2.3 wurden 4.69 g 1-Brom-4-tert-butylbenzol (22.0 mmol) in 50 ml THF mit 25 mmol *n*BuLi lithiiert und mit 4.55 g Tri-*iso*-propylborat (24.2 mmol) in den Boronsäureester überführt. Die Kupplung (18 Stunden, Rückfluß) erfolgte nach Zugabe von 30 ml Wasser, 20 ml DME, 4.00 g 4-Bromnitrobenzol (19.8 mmol), 9.37 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (29.7 mmol) und 0.323 g Pd(PPh₃)₄. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 7:1) ergab 4.30 g 4'-tert-Butyl-4-nitrobiphenyl **97** (85 %). Für den Ames-Test wurde eine kleine Probe umkristallisiert (*n*-Hexan).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 107 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.27 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.72 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.55 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.50 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 1.36 (s, 9 H, -C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 152.2, 147.4, 146.8, 135.7, 127.4, 127.0, 126.1, 124.0, 34.6, 31.2.

MS (70 eV): m/z (%) = 255 (M⁺, 46), 240 (M⁺ - CH₃, 100), 212 (M⁺ - C₃H₇, 21), 165 (17).

CHN-Analyse: Theorie C 75.27 %, H 6.71 %, N 5.49 %, gefunden C 75.09 %, H 6.52 %, N 5.36 %.

I.2.2.5 4'-n-Butyl-4-nitrobiphenyl 98

Die Darstellung erfolgte nach TAV I.2.2.1 durch Kupplung von 1.00 g 4-*n*-Butylphenylboronsäure (5.6 mmol) mit 1.03 g 4-Bromnitrobenzol (5.1 mmol), 2.70 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (8.5 mmol) und 0.060 g Pd(PPh₃)₄ in 35 ml entgastem DME und 6 ml Wasser. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 8:1) ergab 1.04 g 4'-*n*-Butyl-4-nitrobiphenyl **98** (80 %).

Analytik: gelber Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.27 (d, ³J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.71 (d, ³J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.53 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.30 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, H_{arom}), 2.66 (t, ³J = 7.6 Hz, 2 H, Ar-CH₂), 1.63 (pen, ³J = 7.6 Hz, 2 H, Ar-CH₂-CH₂-), 1.38 (sex, 2 H, ³J = 7.6 Hz, -CH₂-CH₃), 0.94 (t, 3 H, ³J = 7.6 Hz, -CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 147.6, 146.8, 144.1, 136.0, 129.2, 127.4, 127.2, 124.1, 35.3, 33.5, 22.3, 13.9.

MS (70 eV): m/z (%) = 241 (M⁺ - CH₂, 35), 226 (241 - CH₃, 100), 180 (226 - NO₂), 152 (M⁺ - NO₂ - C₄H₉, 45).

CHN-Analyse: Theorie C 75.27 %, H 6.71 %, N 5.49 %, gefunden C 75.06 %, H 6.54 %, N 5.52 %.

I.2.2.6 4'-Adamantyl-4-nitrobiphenyl **102**

Nach TAV I.2.2.3 wurden 1.33 g 1-Brom-(1-adamantyl)benzol **187** (4.6 mmol) in 20 ml THF mit 5.0 mmol *n*BuLi lithiiert und mit 0.94 g Tri-*iso*-propylborat (5.0 mmol) in den Boronsäureester überführt. Die Kupplung (18 Stunden, Rückfluß) erfolgte nach Zugabe von 8 ml Wasser, 10 ml DME, 0.833 g 4-Bromnitrobenzol (4.13 mmol), 2.17 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (6.88 mmol) und 0.100 g Pd(PPh₃)₄. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 14:1) ergab 0.89 g 4'-Adamantyl-4-nitrobiphenyl **102** (65 %).

Analytik: gelbe Kristalle, Fp. 194-196 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.27 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.72 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.59 (d, ³J = 8.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.49 (d, ³J = 8.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 2.17 - 2.08 (m, 3 H, -Ad), 1.98 - 1.92 (m, 6 H, -Ad), 1.86-1.72 (m, 6 H, -Ad).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 152.5, 147.5, 146.9, 135.8, 127.5, 127.1, 125.7, 124.0, 43.1, 36.7, 36.3, 28.9.

MS (70 eV): m/z (%) = 333 (M⁺, 100), 276 (M⁺ - C₄H₉, 39), 230 (M⁺ - C₄H₉ - NO₂, 14).

CHN-Analyse: Theorie C 79.25 %, H 6.95 %, N 4.20 %, gefunden C 79.31 %, H 6.84 %, N 3.98 %.

I.2.2.7 4-Nitroterphenylen **103**

Nach TAV I.2.2.3 wurden 2.33 g 4-Brombiphenyl (10 mmol) in 30 ml THF mit 12 mmol *n*BuLi lithiiert und mit 2.06 g Tri-*iso*-propylborat (11 mmol) in den Boronsäureester überführt. Die Kupplung (14 Stunden, Rückfluß) erfolgte nach Zugabe von 13 ml Wasser, 10 ml DME, 1.818 g 4-Bromnitrobenzol (9.0 mmol), 4.26 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (13.5 mmol) und 0.223 g Pd(PPh₃)₄. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 7:1) ergab 1.95 g 4-Nitroterphenylen **103** (79 %). Für den Ames-Test wurde eine kleine Probe aus Toluol umkristallisiert.

Analytik: gelbe Kristalle, Fp. 196-198 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.30 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.73 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.72-7.57 (m, 6 H, H_{arom}), 7.47-7.31 (m, 3 H, H_{arom}).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 147.1, 141.8, 140.1, 137.5, 128.9, 127.8 (2 Signale), 127.7, 127.5, 127.0, 124.1.

MS (70 eV): m/z (%) = 275 (M⁺, 100), 245 (M⁺ - NO, 26), 228 (68).

CHN-Analyse: Theorie C 78.53 %, H 4.76 %, N 5.09 %, gefunden C 78.32 %, H 4.81 %, N 4.91 %.

I.2.2.8 3'-Methyl-4-nitrobiphenyl 99

Nach TAV I.2.2.3 wurden 1.88 g 3-Bromtoluol (11.0 mmol) in 30 ml THF mit 12.1 mmol *n*BuLi lithiiert und mit 2.31 g Tri-*iso*-propylborat (12.3 mmol) in den Boronsäureester überführt. Die Kupplung (15 Stunden, Rückfluß) erfolgte nach Zugabe von 20 ml Wasser, 10 ml DME, 2.02 g 4-Bromnitrobenzol (10.0 mmol), 4.73 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (15.0 mmol) und 0.200 g Pd(PPh₃)₄. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 5:1) ergab 1.85 g 3'-Methyl-4-nitrobiphenyl **99** (87 %).

Analytik: blaßgelbe Nadeln, Fp. 60 °C, Lit. 59-60 °C.²⁴²

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.27 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.71 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.43-7.34 (m, 3 H, H_{arom}), 7.27-7.22 (m, 1 H, H_{arom}), 2.43 (s, 3 H, -CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 147.9, 147.1, 138.9, 138.8, 129.7, 129.1, 128.2, 127.8, 124.6, 124.1, 21.6.

MS (70 eV): m/z (%) = 213 (M⁺, 95), 183 (M⁺ - NO, 46), 165 (71), 152 (M⁺ - NO₂ - CH₃, 100).

CHN-Analyse: Theorie C 73.22 %, H 5.20 %, N 6.57 %, gefunden C 73.31 %, H 5.14 %, N 6.48 %.

I.2.2.9 3',5'-Dimethyl-4-nitrobiphenyl 100

Nach TAV I.2.2.3 wurden 2.77 g 1-Brom-3,5-dimethylbenzol (15.0 mmol) in 30 ml THF mit 16.5 mmol *n*BuLi lithiiert und mit 3.01 g Tri-*iso*-propylborat (16.5 mmol) in den Boronsäureester überführt. Die Kupplung (14 Stunden, Rückfluß) erfolgte nach Zugabe von 20 ml Wasser, 10 ml DME, 2.75 g 4-Bromnitrobenzol (13.6 mmol), 6.44 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (20.4 mmol) und 0.288 g Pd(PPh₃)₄. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 7:1) ergab 2.93 g 3',5'-Dimethyl-4-nitrobiphenyl **100** (95 %).

Analytik: blaßgelbe Kristalle, Fp. 125 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.26 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.70 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.21 (s, 1 H, H_{arom}), 7.08 (s, 2 H, H_{arom}), 2.39 (s, 6 H, -CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 147.9, 146.9, 138.8, 130.6, 127.8, 125.3, 124.0, 21.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 227 (M⁺, 100), 197 (M⁺ - NO, 4), 166 (M⁺ - NO₂ - CH₃, 49), 165 (36),

CHN-Analyse: Theorie C 73.99 %, H 5.77 %, N 6.16 %, gefunden C 73.79 %, H 6.01 %, N 6.00 %.

I.2.2.10 1-Brom-3,5-di-*tert*-butylbenzol 189

Die Darstellung erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Murphy.¹⁴³

Unter Argon wurde in einem abgedunkelten Kolben zu einer Mischung von 0.6 g Eisenpulver, 24.6 g 1,3,5-Tri-*tert*-butylbenzol **188** (0.10 mol) in 50 ml Tetrachlorkohlenstoff bei 0 °C eine Lösung von 9.0 ml Brom (0.18 mol) in 15 ml Tetrachlorkohlenstoff zugetropft und 4 Stunden bei 0 °C nachgerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 60 ml Ether verdünnt, zweimal mit Natronlauge (15 %), mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Fraktionierte Destillation (50 - 80 °C bei 1 mbar) und Umkristallisation der Hauptfraktion aus *n*-Hexan ergab 12.73 g 1-Brom-3,5-di-*tert*-butylbenzol **189** (47 %).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 65 °C, Lit. 63 - 65 °C.¹⁴³

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 7.24 (s, 3 H, H_{arom}), 1.21 (s, 18 H, -C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ = 153.0, 125.8, 122.3, 121.0, 35.0, 31.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 270/268 (M⁺, 9/5), 255/253 (M⁺ - CH₃, 59/71), 57 (C₄H₉, 100).

I.2.2.11 3',5'-Di-*tert*-butyl-4-nitrobiphenyl **101**

Nach TAV I.2.2.3 wurden 2.96 g 1-Brom-3,5-di-*tert*-butylbenzol **189** (11.0 mmol) in 40 ml THF mit 13 mmol *n*BuLi lithiiert und mit 2.08 g Tri-*iso*-propylborat (12.1 mmol) in den Borsäureester überführt. Die Kupplung (16 Stunden, Rückfluß) erfolgte nach Zugabe von 15 ml Wasser, 20 ml DME, 2.02 g 4-Bromnitrobenzol (10.0 mmol), 4.73 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (15.0 mmol) und 0.350 g Pd(PPh₃)₄ (3 mol %). Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 7:1) ergab 1.78 g 3',5'-Di-*tert*-butyl-4-nitrobiphenyl **101** (57 %). Für den Ames-Test wurde eine kleine Probe nochmals chromatographiert (PE/EE 20:1).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 106-108 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 8.29 (d, ³J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.73 (d, ³J = 8.7 Hz, 1 H, H_{arom}), 7.53 (t, ⁴J = 1.7 Hz, 1 H, H_{arom}), 7.43 (d, ⁴J = 1.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 1.39 (s, 9 H, -C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ = 151.7, 148.9, 146.9, 138.3, 128.1, 124.0, 123.1, 121.8, 35.5, 31.5.

MS (70 eV): m/z (%) = 311 (M⁺; 37) 296 (M⁺ - CH₃; 100).

CHN-Analyse: Theorie C 77.14 %, H 8.09 %, N 4.50 %, gefunden C 76.99 %, H 8.38 %, N 4.40 %.

I.2.2.12 4'-Trifluormethyl-4-nitrobiphenyl **126** (TAV: Negishi-Kupplung 1)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Negishi.²⁴³

Unter Argon wurden zu einer Lösung von 1-Brom-4-trifluormethylbenzol (2.54 g, 11.3 mmol) in 25 ml THF vorsichtig mit der Spritze 12.4 mmol *n*BuLi (1.6 M in Hexan, Gehalt bestimmen) bei $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugegeben.ⁱ Nach 1 Stunde ($-100\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow -78\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde das Kältebad entfernt und durch Zugabe einer Lösung von 1.53 g wasserfreiem ZnCl_2 (11.3 mmol) in 20 ml THF und einstündigem Rühren transmetalliert. Im Argongegenstrom wurden 150 mg $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ und 4-Bromnitrobenzolⁱⁱ (9.42 mmol) zugegeben und 18 Stunden bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf EE/Wasser gegossen (im Scheidetrichter, Entfärbung), soviel EE zugegeben bis sich die Phasen gut trennten und die organische Phase mit Salzsäure (5 %) und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 , Entfernung des Lösungsmittels und Reinigung des Rückstandes mit Flashchromatographie (PE/EE 12:1) erhielt man 2.14 g 4'-Trifluormethyl-4-nitrobiphenyl **126** (85 %). Die weitere Reinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Di-*iso*-propylether.

Analytik: blaßgelbe Kristalle, Fp. $107\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.30 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.77-7.71 (m, 6 H, H_{arom}).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 147.7, 146.0, 142.3, 130.9 (q, $^2J_{\text{CF}}$ = 33.2 Hz), 128.1, 127.8, 126.1 (q, $^3J_{\text{CF}}$ = 3.6 Hz), 124.2, 124.1 (q, $^1J_{\text{CF}}$ = 272.2 Hz).

MS (70 eV): m/z (%) = 267 (M^+ , 81), 237 ($\text{M}^+ - \text{NO}$, 38), 209 (41), 201 (59), 152 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2 - \text{CF}_3$, 100).

CHN-Analyse: Theorie C 58.43 %, H 3.02 %, N 5.24 %, gefunden C 58.65 %, H 3.23 %, N 4.97 %.

I.2.2.13 3'-Trifluormethyl-4-nitrobiphenyl **127**

Nach TAV I.2.2.12 wurden 3.38 g 1-Brom-3-trifluormethylbenzol (15.0 mmol) mit 16.5 mmol *n*BuLi (1.6 M in Hexan) in 30 ml THF in die Lithiumspezies überführt und mit 2.04 g trockenem ZnCl_2 (15.0 mmol, gelöst in 20 ml THF) transmetalliert. Die Kupplung mit 2.52 g 4-Bromnitrobenzol (12.5 mmol) und 0.200 g $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Flashchromatographie (PE/EE 9:1) 2.17 g 3'-Trifluormethyl-4-nitrobiphenyl **127** (65 %).

Analytik: gelbe Kristalle, Fp. $79\text{ }^{\circ}\text{C}$, Lit. $86\text{ }^{\circ}\text{C}$.²⁴⁴

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.32 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.87-7.58 (m, 6 H, H_{arom}).

ⁱ Bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ färbte sich die Reaktionsmischung schwarz!

ⁱⁱ Alternativ kann auch 4-Iodnitrobenzol verwendet werden, die Ausbeuten sind dann besser.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 147.7, 146.0, 139.6, 131.7 (q, $^2J_{\text{CF}}$ = 32.8 Hz), 130.7, 129.7, 128.0, 125.5 (q, $^3J_{\text{CF}}$ = 3.7 Hz), 124.3, 124.2 (q, $^3J_{\text{CF}}$ = 3.8 Hz), 123.9 (q, $^1J_{\text{CF}}$ = 272.4 Hz).

MS (70 eV): m/z (%) = 267 (M^+ , 100), 237 ($\text{M}^+ - \text{NO}$, 48), 209 (46), 201 (68), 152 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2 - \text{CF}_3$, 36).

CHN-Analyse: Theorie C 58.43 %, H 3.02 %, N 5.24 %, gefunden C 58.32 %, H 3.11 %, N 5.17 %.

I.2.2.14 3',5'-Di(trifluormethyl)-4-nitrobiphenyl **128**

Nach TAV I.2.2.12 wurden 3.40 g 1-Iod-3,5-di(trifluormethyl)benzol (10.0 mmol) mit 11.0 mmol *n*BuLi (1.6 M in Hexan) in 25 ml THF in die Lithiumspezies überführt und mit 1.36 g trockenem ZnCl_2 (10.0 mmol, gelöst in 20 ml THF) transmetalliert. Die Kupplung mit 1.68 g 4-Bromnitrobenzol (8.33 mmol) und 0.180 g $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Umkristallisation aus Di-*iso*-propylether und Flashchromatographie (PE/EE 9:1) 1.87 g 3',5'-Di(trifluormethyl)-4-nitrobiphenyl **128** (67 %).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 117°C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.36 (d, 3J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 8.03 (s, 2 H, H_{arom}), 7.94 (s, 1 H, H_{arom}), 7.78 (d, 3J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 148.2, 144.3, 141.0, 132.7 (q, $^2J_{\text{CF}}$ = 33.6 Hz), 128.3, 127.5, 124.5, 122.4 (q, $^3J_{\text{CF}}$ = 3.7 Hz), 124.3, 123.1 (q, $^1J_{\text{CF}}$ = 273.0 Hz).

MS (70 eV): m/z (%) = 335 (M^+ , 100), 305 ($\text{M}^+ - \text{NO}$, 47), 269 (81), 220 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2 - \text{CF}_3$, 59).

CHN-Analyse: Theorie C 50.16 %, H 2.10 %, N 4.18 %, gefunden C 50.34 %, H 2.31 %, N 4.25 %.

I.2.2.15 4'-Methyl-4-aminobiphenyl **111** (TAV: SnCl_2 -Reduktion)

Die Darstellung erfolgte nach einer Methode von Bellamy.²⁴⁵

Eine Mischung aus 1.06 g 4'-Methyl-4-nitrobiphenyl **94** (5.00 mmol) und 5.64 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25.00 mmol) in 15 ml EtOH und 15 ml EE wurde unter Argon solange refluxiert, bis kein Edukt mehr nachweisbar war (DC-Kontrolle, 1 Stundeⁱ). Die gekühlte Lösung wurde auf Eis gegossen, mit NaHCO_3 -Lösung oder K_2CO_3 (5 %) entsäuert (Bildung von SnO_2) und mehrfach mit EE extrahiert.ⁱⁱ Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene

ⁱ In einigen Fällen mußte bis zu 3 Stunden refluxiert werden.

ⁱⁱ Zur vollständigen Entfernung des SnO_2 empfiehlt es sich, die Lösung zu zentrifugieren.

eingedampft. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/PE, 1:3) erhielt man 0.824 g 4'-Methyl-4-aminobiphenyl **111** (90 %).

Analytik: weiße Kristalle, Fp. 97 °C, Lit. 97-98 °C.²⁴¹

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 7.36 (d, ³J = 8.1 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.32 (d, ³J = 8.0 Hz, 2 H), 7.12 (d, ³J = 8.0 Hz, 2 H), 6.65 (d, ³J = 8.1 Hz, 2 H), 3.65 (s_{br}, 2 H, NH₂), 2.29 (s, 3 H, CH₃). Die ¹H-NMR-Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.¹⁵¹

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ = 145.4, 138.2, 135.8, 131.5, 129.2, 127.7, 126.1, 115.3, 20.9.

MS (70 eV): m/z (%) = 183 (M⁺, 100), 182 (M⁺ - H, 52), 167 (M⁺ - H - CH₃, 12), 165 (13).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₃H₁₃N 183.1048, gefunden 183.1050.

I.2.2.16 4'-tert-Butyl-4-aminobiphenyl 116

Nach TAV I.2.2.15 ergab die Reduktion von 0.918 g 4'-tert-Butyl-4-nitrobiphenyl **97** (3.60 mmol) mit 4.41 g SnCl₂ · 2 H₂O (18.00 mmol) in 12 ml EtOH und 12 ml EE nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/PE, 1:3) 0.706 g 4'-tert-Butyl-4-aminobiphenyl **116** (87 %).

Analytik: farblose Kristalle.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 7.40 - 7.27 (m, 2 H, H_{arom}), 6.65 (d, ³J = 8.1 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.65 (s_{br}, 2 H, NH₂), 1.27 (s, 9 H, -tBu).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ = 149.2, 138.2, 132.0, 131.5, 127.8, 126.1, 125.7, 115.4, 34.4, 31.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 225 (M⁺, 70), 210 (M⁺ - CH₃, 100), 91 (40).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₆H₁₉N 225.3331, gefunden 225.3333.

I.2.2.17 3'-Methyl-4-aminobiphenyl 112

Nach TAV I.2.2.15 ergab die Reduktion von 0.833 g 3'-Methyl-4-nitrobiphenyl **99** (3.60 mmol) mit 4.41 g SnCl₂ · 2 H₂O (18.00 mmol) in 12 ml EtOH und 12 ml EE nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/PE, 1:3) 0.580 g 3'-Methyl-4-aminobiphenyl **112** (88 %).

Analytik: farbloses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 7.42 - 7.23 (m, 5 H, H_{arom}), 7.09 (d, ³J = 7.3 Hz, 1 H, H_{arom}), 6.74 (d, ³J = 8.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.70 (s_{br}, 2 H, NH₂), 2.40 (s, 3 H, CH₃). Die ¹H-NMR-Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.²⁴²

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 145.7, 141.1, 138.1, 131.7, 128.5, 128.0, 127.2, 127.0, 123.5, 115.3, 21.5.

MS (70 eV): m/z (%) = 183 (M^+ , 100), 182 ($\text{M}^+ - \text{H}$, 25), 167 ($\text{M}^+ - \text{H} - \text{CH}_3$, 16), 165 (12).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}$ 183.1048, gefunden 183.1051.

I.2.2.18 3',5'-Dimethyl-4-aminobiphenyl 113

Nach TAV I.2.2.15 ergab die Reduktion von 0.909 g 3',5'-Dimethyl-4-nitrobiphenyl **100** (4.00 mmol) mit 4.51 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (20.00 mmol) in 13 ml EtOH und 13 ml EE nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/PE, 1:4) 0.726 g 3',5'-Dimethyl-4-aminobiphenyl **113** (92 %).

Analytik: farblose Kristalle.

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7.41 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.17 (s, 2 H, H_{arom}), 6.93 (s, 1 H, H_{arom}), 6.73 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.62 (s_{br} , 2 H, NH_2), 2.37 (s, 6 H, CH_3).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 145.6, 141.1, 138.1, 131.8, 128.0, 127.9, 124.3, 115.3, 21.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 197 (M^+ , 100), 181 ($\text{M}^+ - \text{H} - \text{CH}_3$, 16), 180 (14), 165 (6).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}$ 197.1204, gefunden 197.1200.

I.2.2.19 4'-Trifluormethyl-4-aminobiphenyl 130

Nach TAV I.2.2.15 ergab die Reduktion von 0.989 g 4'-Trifluormethyl-4-nitrobiphenyl **126** (3.70 mmol) mit 4.17 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (18.5 mmol) in 20 ml EtOH nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/PE, 1:4) 0.540 g 4'-Trifluormethyl-4-aminobiphenyl **130** (62 %). Außerdem bildete sich ein stark fluoreszierendes Nebenprodukt.

Analytik: farblose Kristalle.

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7.63 (m, 4 H, H_{arom}), 7.42 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.75 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.78 (s_{br} , 2 H, NH_2).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 146.7, 144.6, 129.7, 128.3, 128.2 (q, $^2\text{J}_{\text{C-F}}$ = 32.2), 126.4, 125.6 (q, $^3\text{J}_{\text{C-F}}$ = 3.7), 124.5 (q, $^1\text{J}_{\text{C-F}}$ = 272.8), 115.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 237 (M^+ , 100), 167 ($\text{M}^+ - \text{H} - \text{CF}_3$, 13).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NF}_3$ 237.0766, gefunden 237.0771.

I.2.2.20 3'-Trifluormethyl-4-aminobiphenyl 131

Nach TAV I.2.2.15 ergab die Reduktion von 0.400 g 3'-Trifluormethyl-4-nitrobiphenyl **127** (1.496 mmol) mit 1.69 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (7.49 mmol) in 15 ml EtOH und 15 ml EE nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/PE, 1:4) 0.337 g 3'-Trifluormethyl-4-aminobiphenyl **131** (95 %).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 66 °C, Lit. 65 °C.²⁴⁴

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7.77 - 7.65 (m, 2 H, H_{arom}), 7.51 - 7.46 (m, 2 H, H_{arom}), 7.41 (d, 3J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.75 (d, 3J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.77 (s_{br}, 2 H, NH_2).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 146.5, 141.9, 131.0 (q, $^2J_{\text{CF}}$ = 32.2 Hz), 129.5, 129.1, 128.1, 124.4 (q, $^1J_{\text{CF}}$ = 271.8 Hz), 123.0 (q $^3J_{\text{CF}}$ = 3.7 Hz), 122.8 (q, $^3J_{\text{CF}}$ = 3.8 Hz), 115.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 237 (M^+ , 100), 167 ($\text{M}^+ - \text{H} - \text{CF}_3$, 17).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NF}_3$ 237.0766, gefunden 237.0763.

I.2.2.21 3',5'-Di(trifluormethyl)-4-aminobiphenyl 132

Nach TAV I.2.2.15 ergab die Reduktion von 0.864 g 3',5'-Di(trifluormethyl)-4-nitrobiphenyl **128** (2.578 mmol) mit 2.91 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (12.88 mmol) in 15 ml EtOH und 10 ml EE nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/PE, Gradient 1:4 \rightarrow 1:3) 0.540 g 3',5'-Di(trifluormethyl)-4-aminobiphenyl **132** (69 %).

Analytik: farblose Kristalle.

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7.93 (s, 2 H, H_{arom}), 7.74 (s, 1 H, H_{arom}), 7.42 (d, 3J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.77 (d, 3J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.84 (s_{br}, 2 H, NH_2).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 147.3, 143.2, 131.9 (q, $^2J_{\text{CF}}$ = 33.1 Hz), 128.2, 126.2, 123.5 (q, $^1J_{\text{CF}}$ = 272.7 Hz), 119.6 (sep, $^3J_{\text{CF}}$ = 3.8 Hz), 115.5.

MS (70 eV): m/z (%) = 305 (M^+ , 100), 286 ($\text{M}^+ - \text{F}$, 8), 167 ($\text{M}^+ - 2 \text{CF}_3$, 6).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NF}_6$ 305.0639, gefunden 305.0635.

I.2.3 4-Nitrobiphenyle und 4-Aminobiphenyle mit Hydroxy-/Alkoxysubstituenten**I.2.3.1 4'-(Phenylcarbonyloxy)biphenyl 210**

Unter Kühlung wurden 28.1 g frisch destilliertes Benzoylchlorid (0.20 mol) zu einer gerührten Mischung von 34.0 g 4-Hydroxybiphenyl (0.20 mol) in 200 ml trockenem Pyridin ge-

tropft. Man erhitzte über Nacht unter Rückfluß (Trockenrohr!) und goß die abgekühlte Mischung auf Eiswasser. Der weiße Niederschlag wurde abgesaugt, mehrfach mit Wasser gewaschen und getrocknet. Umkristallisation aus Toluol/EtOH (1:1) ergab 51.2 g 4'-(Phenylcarbonyloxy)biphenyl **210** (93 %).

Analytik: feine weiße Nadeln, Fp. 150 °C, Lit. 149 - 150 °C.²⁴⁶

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.27 (d, ³J = 7.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.71 - 7.30 (m, 12 H, H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 165.1, 150.4, 140.3, 139.0, 133.5, 130.1, 129.5, 128.7, 128.5, 128.1, 127.3, 127.1, 121.9.

MS (70 eV): m/z (%) = 274 (M⁺, 16), 105 (PhCO, 100).

I.2.3.2 4'-Phenylcarbonyloxy-4-nitrobiphenyl **124**

Die Darstellung erfolgte in Ansatz und Durchführung nach der Vorschrift von Jones.²⁴⁷

Die Umkristallisation des rohen 4'-Phenylcarbonyloxy-4-nitrobiphenyls aus insgesamt 800 ml Eisessig ergab 22.0 g reines Produkt **124** (47 %). Für den Ames-Test wurde eine kleine Probe nochmals aus Propanol-1 umkristallisiert.

Analytik: schwach gelbe Kristalle, Fp. 110 °C, Lit. 109 - 110 °C.²⁴⁷

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.30 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 8.21 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.76 - 7.47 (m, 7 H, H_{arom}), 7.35 (d, ³J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 165.0, 151.7, 146.8, 146.7, 136.5, 133.8, 130.2, 129.2, 128.7, 128.6, 127.8, 124.2, 122.5.

MS (70 eV): m/z (%) = 319 (M⁺, 2), 207 (2), 105 (PhCO, 100).

I.2.3.3 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139**

I) Aus 4'-*n*-Butoxy-4-nitrobiphenyl **148**

Zu einer Lösung von 1.00 g *n*-Butoxy-4-nitrobiphenyl **148** (3.69 mmol) in 5 ml DCM wurde bei 0 °C eine Lösung von 1.48 g BBr₃ (5.89 mmol) in 10 ml DCM mit der Spritze zugegeben. Nach 5 Minuten wurde das Eisbad entfernt und 2 Stunden bei RT gerührt. Die Lösung wurde auf Eiswasser gegossen, dreimal mit DCM extrahiert, die organische Phase noch mal mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel

befreit. Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 3:1) ergab 0.634 g 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** (80 %)ⁱ

II) Aus 4'-Phenylcarbonyloxy-4-nitrobiphenyl **124**

Ausgehend von 18.0 g 4'-Phenylcarbonyloxy-4-nitrobiphenyl **124** (56.4 mmol) erfolgte die Hydrolyse nach der Vorschrift von Jones²⁴⁷ und ergab 14.2 g des tiefblauen Kaliumsalzes von 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** (99 %). 14.0 g dieser Kristalle wurden in 50 ml kochendem Wasser suspendiert und mit konz. Salzsäure versetzt, bis sich kein weiterer gelber Niederschlag mehr bildete. Das Produkt wurde abgesaugt, mehrfach mit Wasser gewaschen, getrocknet (11 g) und aus Toluol/EtOH (2:1) umkristallisiert. Ausbeute: 7.80 g (66 %). Durch Einengen der Mutterlauge wurden weitere 1.50 g 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** isoliert. Da das Produkt schlecht löslich in DCM und Chloroform ist, wurde das ¹³C-Spektrum in deuteriertem THF aufgenommen.

Analytik: gelbe Kristalle, Fp. 200 °C, Lit. 200 - 201 °C.²⁴⁷

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.25 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.66 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.52 (d, ³J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.94 (d, ³J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 5.07 (s, 1 H, -OH).

¹³C-NMR (THF, 75 MHz) δ = 160.2, 148.5, 147.7, 130.7, 129.7, 127.8, 125.0, 117.1.

MS (70 eV): m/z (%) = 215 (M⁺, 100), 185 (M⁺ - NO, 18), 169 (M⁺ - NO₂, 21), 157 (13), 141 (20), 139 (27), 115 (18).

I.2.3.4 4'-Methoxy-4-nitrobiphenyl **140**

Nach TAV I.2.2.1 wurden 1.85 g 4-Methoxyphenylboronsäure²⁴⁸ (12.2 mmol) und 2.24 g 4-Bromnitrobenzol (11.1 mmol) in Gegenwart von 5.25 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O (16.6 mmol) und 0.120 g Pd(PPh₃)₄ in 60 ml DME und 11 ml Wasser gekuppelt (14 Stunden). Aufarbeitung und Flashchromatographie (PE/EE 7:1) ergab 2.13 g 4'-Methoxy-4-nitrobiphenyl **140** (76 %). Zur weiteren Reinigung wurde aus *n*-Hexan umkristallisiert.

Analytik: zitronengelbe Kristalle, Fp. 108 °C, Lit. 106 - 107 °C.²⁴⁹

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.23 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.65 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.55 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.99 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.85 (s, 3 H, -OCH₃). Die ¹H-Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁴⁹

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 160.4, 147.2, 146.5, 131.0, 128.5, 127.0, 124.1, 114.6, 55.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 229 (M⁺, 100), 199 (40), 168 (M⁺ - CH₃ - NO₂, 43), 139 (85).

ⁱ Die Verbindung war zu 3 % mit einem Isomer verunreinigt, das nicht vollständig abgetrennt werden konnte.

CHN-Analyse: Theorie C 68.11 %, H 4.84 %, N 6.11 %, gefunden C 67.99 %, H 4.85 %, N 6.07 %.

I.2.3.5 4'-Methoxy-4-aminobiphenyl **151**

Nach TAV I.2.2.15 ergab die Reduktion von 0.400 g 4'-Methoxy-4-nitrobiphenyl **140** (1.75 mmol) mit 1.97 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (8.72 mmol) in 10 ml EtOH und 10 ml EE nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/PE, 1:2) 0.278 g 4'-Methoxy-4-aminobiphenyl **151** (80 %). Die Verbindung ist licht- und luftempfindlich und färbt sich in Lösung schnell rosa.

Analytik: weißer Feststoff, Fp. 146 °C.

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7.44 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.29 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.93 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.73 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.82 (s, 3 H, $-\text{OCH}_3$), 3.67 (s_{br}, 2 H, NH_2).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 158.4, 145.3, 134.0, 131.4, 127.6, 127.4, 115.4, 114.1, 55.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 199 (M^+ , 100), 184 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 63), 156 (21).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}$ 199.0997, gefunden 199.0994.

I.2.3.6 4'-Ethoxy-4-nitrobiphenyl **145**

Nach TAV I.2.2.1 wurden 1.83 g 4-Ethoxyphenylboronsäure²⁴⁸ (11.0 mmol) und 2.02 g 4-Bromnitrobenzol (10.0 mmol) in Gegenwart von 4.88 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (16.6 mmol) und 0.120 g $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in 50 ml DME und 10 ml Wasser gekuppelt (16 Stunden). Aufarbeitung und Flashchromatographie (PE/EE 7:1) ergab 1.80 g 4'-Ethoxy-4-nitrobiphenyl **145** (74 %).

Analytik: weißer Feststoff, Fp. 108 °C, Lit. 107 - 108 °C.²⁵⁰

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.22 (d, 3J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.65 (d, 3J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.54 (d, 3J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.98 (d, 3J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 4.07 (q, 3J = 7.0 Hz, 2 H, $-\text{OCH}_2$), 1.45 (t, 3J = 7.0 Hz, 3 H, $-\text{CH}_3$).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 159.8, 147.2, 146.4, 130.8, 128.5, 126.9, 124.1, 115.1, 63.6, 14.7.

MS (70 eV): m/z (%) = 243 (M^+ , 100), 215 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_4$, 39), 185 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_4$, - NO, 26), 169 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{NO}_2$, 13), 168 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_5 - \text{NO}_2$, 13), 141 (17).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}$ 243.0895, gefunden 243.0896.

I.2.3.7 4'-Ethoxy-4-aminobiphenyl 211

Nach TAV I.2.2.15 ergab die Reduktion von 1.20 g 4'-Ethoxy-4-nitrobiphenyl **145** (4.93 mmol) mit 4.96 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (22.0 mmol) in 15 ml EtOH und 15 ml EE nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (Chloroform) 788 mg 4'-Ethoxy-4-aminobiphenyl **211** (75 %).

Analytik: weißer Feststoff, Fp. 144 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7.44 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.35 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.92 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.72 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 4.02 (q, 3J = 7.0 Hz, 2 H, $-\text{OCH}_2$), 3.65 (s_{br} , 2 H, NH_2), 1.42 (t, 3J = 7.0 Hz, 3 H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 157.8, 145.2, 133.7, 131.4, 127.5, 127.3, 115.4, 114.7, 63.5, 14.9.

MS (70 eV): m/z (%) = 213 (M^+ , 96), 184 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_5$, 100), 156 (18).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}$ 213.1154, gefunden 213.1155.

I.2.3.8 4'-iso-Propoxy-4-nitrobiphenyl 146

Die Darstellung erfolgte nach der Methode von Allen.²⁵¹

Eine Mischung aus 2.15 g 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** (10.0 mmol), 1.38 g Kaliumcarbonat (10.0 mmol) und 1.48 g 2-Brompropan (12.0 mmol) in 25 ml Aceton wurde 4 Tage refluxiert (Trockenrohr). Nach einem Tag wurden noch einmal 12 mmol Alkylierungsmittel zugesetzt. Obwohl auch nach 4 Tagen erst ein Teil des 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyls umgesetzt war (DC-Kontrolle), wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand mit DCM verdünnt, die Lösung filtriert (Filterkuchen mit DCM waschen) und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Reinigung des verbleibenden Feststoffs durch Säulenchromatographie (PE/EE 5:1) ergab 0.601 g 4'-iso-Propoxy-4-nitrobiphenyl **146** (23 %).ⁱ

Analytik: gelber Feststoff, Fp. 76 - 78, Lit. 77 - 78 °C.²⁵⁰

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.23 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.65 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.54 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.97 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 4.61 (pen, 3J = 6.0 Hz, 1 H, $-\text{OCH}$), 1.36 (d, 3J = 6.0 Hz, 6 H, 2 CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 158.8, 147.2, 146.4, 130.6, 128.5, 126.9, 124.0, 116.3, 70.0, 21.9.

MS (70 eV): m/z (%) = 257 (M^+ , 21), 215 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6$, 100), 185 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6 - \text{NO}$, 28), 169 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6 - \text{NO}_2$, 20).

ⁱ Ursache für die niedrige Ausbeute ist die schlechte Löslichkeit des 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyls in Aceton. Siehe auch im Hauptteil.

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $C_{15}H_{15}NO_3$ 257.1052, gefunden 257.1057.

I.2.3.9 4-Brom-*tert*-butoxybenzol **199**

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Masada.²⁵²

Unter Rühren wurden zu einer eisgekühlten Suspension von 51.90 g 4-Bromphenolⁱ (0.30 mol) in 4.06 g Pyridin (51.3 mmol) und 15 ml DCM 7.03 g *tert*-Butylbromid (51.3 mmol) zugetropft. Nach 15 Min wurde das Eisbad entfernt und über Nacht bei 30 °C im verschlossenen Kolben gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in eine Wasser/Ethylenglykol (8:1) gegossen (Bildung von 2 Phasen) und viermal mit 80 ml Pentan extrahiert (3-Phasen-System). Die Pentanphase wurde dreimal mit je 30 ml Natronlauge (5 %) und einmal mit Wasser extrahiert und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Vakuumdestillation des Rückstandes im Kugelrohrföfen erhielt man 10.5 g 4-Brom-*tert*-butoxybenzol **199** (90 %).

Analytik: farbloser Feststoff.

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 7.34 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.85 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 1.31 (s, 9 H, *t*Bu). Die 1H -NMR Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.²⁵³

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 154.6, 131.9, 125.8, 116.1, 78.9, 28.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 230/228 (M^+ , 1/1), 215/213 ($M^+ - CH_3$, 1/1), 174/172 ($M^+ - C_4H_8$, 100/89).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $C_{10}H_{13}OBr$ 228.0150, gefunden 228.0150.

I.2.3.10 4'-*tert*-Butoxy-4-nitrobiphenyl **147**

Nach TAV I.2.2.3 wurden 2.29 g 4-Brom-*tert*-butoxybenzol **199** (10 mmol) in 30 ml THF mit 12 mmol *n*BuLi lithiiert und mit 2.06 g Tri-*iso*-propylborat (11 mmol) in den Boronsäureester überführt. Die Kupplung (15 Stunden, Rückfluß) erfolgte nach Zugabe von 13 ml Wasser, 10 ml DME, 1.82 g 4-Bromnitrobenzol (9.0 mmol), 4.26 g $Ba(OH)_2 \cdot 8 H_2O$ (13.5 mmol) und 0.177 g $Pd(PPh_3)_4$. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 6:1) ergab 2.07 g 4'-*tert*-Butoxy-4-nitrobiphenyl **147** (85 %).

Analytik: blaßgelber Feststoff.

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 8.23 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.67 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.51 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.07 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 1.38 (s, 9 H, *t*Bu).

ⁱ Vorsicht! 4-Bromphenol hat einen widerwärtigen, lang anhaltenden Geruch.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 156.6, 147.1, 146.7, 133.3, 127.9, 127.2, 124.2, 124.0, 79.1, 28.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 271 (M^+ , 0.3), 256 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 2), 215 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$, 100), 185 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8 - \text{NO}$, 5), 169 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8 - \text{NO}_2$, 8).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ 271.1208, gefunden 271.1206.

I.2.3.11 4'-tert-Butoxy-4-aminobiphenyl **152**

Die Reduktion wurde in einem 100 ml Stickstoffkolben mit aufgesetztem Schliffhahn und Dreiwegehahn (1. Apparatur, 2. Wasserstoffbombe, 3. Schlenk-Line) und einem Ballon am Seitenhahn als Wasserstoffreservoir durchgeführt. Nachdem man in den Kolben 0.314 g 4'-tert-Butoxy-4-nitrobiphenyl **147** (1.157 mmol), 50 mg Pd auf Kohle (10 %) und 15 ml Dioxan gefüllt hatte, wurde die Apparatur, einschließlich des Ballons, über den Dreiwegehahn evakuiert, anschließend Wasserstoff eingeleitet bis der Ballon aufgeblasen war und unter Rühren bei 30 °C und schwachem (!) Wasserstoffüberdruck über Nacht hydriert. Nach der Reaktion wurde der Wasserstoff abgeblasen (Abzug), die Reaktionsmischung mit Dioxan verdünnt, abfiltriert, getrocknet (MgSO_4) und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Reinigung durch Säulenchromatographie (EE/PE, 1:3.5) ergab 0.223 g 4'-tert-Butoxy-4-aminobiphenyl **152** (80 %).

Analytik: weißer Feststoff, oxidationsempfindlich.

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7.41 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.37 (d, 3J = 8.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.00 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.72 (d, 3J = 8.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.70 (s_{br}, 2 H, NH_2), 1.35 (s, 9 H, *t*Bu).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 154.0, 145.4, 136.2, 131.3, 127.7, 126.7, 124.3, 115.4, 78.4, 28.9.

MS (70 eV): m/z (%) = 241 (M^+ , 8), 185 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$, 100).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}$ 241.1467, gefunden 241.1469.

I.2.3.12 4-Brom-*n*-butoxybenzol **197**

Die Darstellung erfolgte nach einer Vorschrift aus dem Organikum.²⁵⁴

Unter Rühren wurden in eine Natriumethanolatlösung (hergestellt aus 0.25 mol Natrium und 400 ml Ethanol) 34.60 g 4-Bromphenol (0.20 mol) eingetragen. Nach Zugabe von 27.4 g 1-Brombutan (0.20 mol) wurde 5 Stunden unter Feuchtigkeitsausschluß refluxiert. Anschließend wurde das Ethanol aus dem Reaktionsgemisch weitgehend abdestilliert, der Rückstand in 100 ml Natronlauge (5 %) gegossen und mehrfach mit Diethylether extrahiert. Die organi-

sche Phase wurde mit Wasser gewaschen und getrocknet (CaCl_2). Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Vakuumdestillation (92 °C bei 0.48 mbar) erhielt man 33.9 g 4-Brom-*n*-butoxybenzol **197** (74 %).

Analytik: farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7.34 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.76 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.90 (t, 3J = 6.5 Hz, 2 H, $\text{Ar-CH}_2\text{-}$), 1.82 - 1.67 (m, 2 H, $\text{Ar-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 1.56 - 1.37 (m, 2 H, $\text{-CH}_2\text{CH}_3$), 0.96 (t, 3J = 7.3 Hz, 3 H, -CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 158.2, 132.1, 116.2, 112.5, 67.9, 31.2, 19.2, 13.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 230/228 (M^+ , 15/13), 174/172 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$, 100/84).

I.2.3.13 4'-*n*-Butoxy-4-nitrobiphenyl **148** (TAV, Negishi-Kupplung 2)

Unter Argon wurden zu einer Lösung von 2.75 g 4-Brom-*n*-butoxybenzol **197** (12.0 mmol) in 20 ml Ether bei -78 °C vorsichtig 24.0 mmol *t*BuLi (1.7 M, in Pentan, Gehalt bestimmen) mit einer Spritze zugegeben. Nach 30 Min. wurde das Kältebad entfernt, 20 ml THF zugegeben und die Lösung im Vakuum auf etwa 30 ml konzentriert. Transmetallierung erfolgte durch Zugabe einer Lösung von 1.64 g wasserfreiem ZnCl_2 (12.0 mmol) in 20 ml THF, wobei sich eine klare Lösung bildete. Im Argongegenstrom wurden 230 mg $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2 mol %) und 2.49 g 4-Iodnitrobenzol (10.0 mmol) in Portionen zugegeben. Dabei erwärmte sich die Lösung schwach und wurde tiefgrün. Nach 16 Stunden Rühren unter Argon wurde die Lösung auf EE/Wasser gegossen (im Scheidetrichter, Entfärbung), soviel EE zugegeben bis sich die Phasen gut trennten und die organische Phase mit Salzsäure (5 %) und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Trocknen über MgSO_4 , Entfernung des Lösungsmittels und Reinigung des Rückstandes mit Flashchromatographie (Chloroform/PE 1:3) ergab 2.03 g 4'-*n*-Butoxy-4-nitrobiphenyl **148** (75 %).

Analytik: blaßgelbe Kristalle, Fp. 84 - 86 °C, Lit. 81 °C.²⁵⁵

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.23 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.66 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.54 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.98 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 4.00 (t, 3J = 6.5 Hz, 2 H, $\text{-OCH}_2\text{-}$), 1.79 (Ψ_{pen} , 2 H, $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 1.50 (Ψ_{sex} , 2 H, $\text{-CH}_2\text{CH}_3$), 0.92 (t, 3J = 7.4 Hz, 3 H, -CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 160.1, 147.2, 146.5, 130.8, 128.5, 126.9, 124.1, 115.1, 67.9, 31.2, 19.2, 13.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 271 (M^+ , 45), 215 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$, 100), 185 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$, - NO, 33), ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$ - NO_2 , 43).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $C_{16}H_{17}NO_3$ 271.1208, gefunden 271.1207.

I.2.3.14 4'-*n*-Butoxy-4-aminobiphenyl **212**

Nach TAV I.2.2.15 ergab die Reduktion von 1.75 g 4'-*n*-Butoxy-4-nitrobiphenyl **148** (6.45 mmol) mit 7.28 g $SnCl_2 \cdot 2 H_2O$ (32.3 mmol) in 15 ml EtOH und 15 ml EE nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (Chloroform) 1.24 g 4'-*n*-Butoxy-4-aminobiphenyl **212** (80 %).

Analytik: weißer Feststoff, Fp. 94 °C.

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 7.39 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.31 (d, 3J = 8.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.88 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.68 (d, 3J = 8.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.94 (t, 3J = 6.5 Hz, 3 H, $-OCH_2$), 3.62 (s_{br} , 2 H, NH_2), 1.73 (Ψ_{pen} , 2 H, $-OCH_2CH_2$), 1.45 (sex, 3J = 7.4 Hz, 2 H, $-CH_2CH_3$), 0.94 (t, 3J = 7.4 Hz, 3 H, $-CH_3$).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 158.0, 145.2, 133.7, 131.5, 127.6, 127.3, 115.4, 114.7, 67.8, 31.4, 19.3, 13.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 241 (M^+ , 70), 185 ($M^+ - C_4H_8$, 63), 156 (14).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $C_{16}H_{19}NO$ 241.1467, gefunden 241.1469.

I.2.3.15 1-Adamantylphenylether **204**

Die Darstellung erfolgte nach einer Vorschrift von Novikov.²⁵⁶

Unter gutem Rühren wurde eine Mischung aus 30.0 g 1-Bromadamantan (139 mmol), 24.0 g Natriumphenolatⁱ (207 mmol) und 60 ml trockenem Pyridin solange refluxiert, bis eine homogene Lösung entstanden war. Nach kurzer Abkühlung und Austausch des Rückflußkühlers gegen eine Claisenbrücke wurde langsam auf 230 °C (Ölbad!) erhitzt, wobei das Pyridin langsam abdestillierte und 6 Stunden bei dieser Temperatur gehalten (Rühren!). Man ließ abkühlen, extrahierte die Reaktionsmischung mit viel DCM, wusch die organische Phase zuerst mehrfach mit kalter Natronlauge (5 %), dann mit Wasser bis zur neutralen Reaktion und trocknete über $MgSO_4$. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand im Vakuum destilliert (Marburger Modell). Die Reaktion wurde mehrfach durchgeführt und man erhielt 13 - 16 g des Ethers **204** (41 - 50 %). Zur weiteren Reinigung wurde aus Methanol umkristallisiert.

ⁱ Herstellung aus Natriumethanolatlösung und trockenem Phenol (unter Argon). Anschließend wurde der Alkohol unter vermindertem Druck vollständig abdestilliert. Das Natriumphenolat sollte weder Alkohol noch Wasser enthalten.

Analytik: farbloser Feststoff, Fp. 100 °C, Lit. 101 - 102 °C.²⁵⁶

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 7.3 - 6.90 (m, 5 H, H_{arom}), 2.20 - 2.10 (m, 3 H), 1.91 - 1.82 (m, 6 H), 1.74 - 1.54 (m, 6 H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 154.0, 128.6, 124.9, 123.6, 77.6, 42.8, 36.1, 30.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 228 (M⁺, 2), 135 (M⁺ - OPh, 100), 93 (M⁺ - C₁₀H₁₅, 17).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₆H₂₀O 128.1514, gefunden 128.1518.

I.2.3.16 4-(1-Adamantoxy)brombenzol **204** (TAV: Bromierung mit 2,4,4,6-Tetrabromcyclohexa-2,5-dienon)

Die Darstellung erfolgte nach einer Methode von Caló.²⁵⁷

Zu einer Lösung von 4.56 g Adamantylphenylether **200** (20.0 mmol) in 40 ml DCM wurde bei -10 °C eine Suspension von 8.19 g 2,4,4,6-Tetrabromcyclohexa-2,5-dienon²⁵⁷ (20.0 mmol) in 20 ml DCM langsam getropft und solange gerührt, bis kein Edukt mehr nachweisbar war (über Nacht, RT). Zur Entfernung des Tribromphenols wurde die Reaktionsmischung mehrfach mit Natronlauge geschüttelt, mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ kurz getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie (150 g Kieselgel, DCM/PE 1:4) erhielt man 5.47 g 4-(1-Adamantoxy)brombenzol **204** (89 %).

Analytik: gelblicher Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz, CDCl₃): δ = 7.34 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.84 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 2.25 - 2.10 (m, 3 H), 1.92 - 1.80 (m, 6 H), 1.68 - 1.46 (m, 6 H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ = 153.2, 131.7, 126.7, 116.5, 78.3, 42.7, 36.1, 30.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 307/305 (M⁺, 5/3), 173/171 (M⁺ - C₁₀H₁₄), 135 (C₁₀H₁₅, 100).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₆H₁₉OBr 306.0619, gefunden 306.0616.

I.2.3.17 4'-(1-Adamantoxy)-4-nitrobiphenyl **150**

Nach TAV I.2.2.12 wurden 3.07 g 4-(1-Adamantoxy)brombenzol **204** (10.0 mmol) mit 11.0 mmol *n*BuLi (1.6 M in Hexan) in 25 ml THF in die Lithiumspezies überführt und mit 1.45 g trockenem ZnCl₂ (10.6 mmol, gelöst in 15 ml THF) transmetalliert. Die Kupplung mit 2.24 g 4-Iodnitrobenzol (9.00 mmol) und 0.400 g Pd(PPh₃)₄ (~ 4 mol %) ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Umkristallisation aus PE/EE (1:1) 2.55 g 4'-(1-Adamantoxy)-4-

nitrobiphenyl **150** (81 %). Ein Teil des Produkts wurde für den Ames-Test zusätzlich durch Flashchromatographie (PE/EE 4:1) gereinigt.

Analytik: schwach gelbe Kristalle.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, CDCl_3): δ = 8.24 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.68 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.51 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.08 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 2.23 - 2.14 (m, 3 H), 1.94 - 1.80 (m, 6 H), 1.70 - 1.55 (m, 6 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 155.3, 147.1, 146.6, 133.7, 127.7, 127.3, 135.3, 124.0, 78.5, 42.8, 36.0, 30.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 349 (M^+ , 2), 215 ($\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{14}$, 2), 185 ($\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{14} - \text{NO}$, 1), 135 ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}$, 100).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ 349.1678, gefunden 349.1680.

I.2.3.18 4-Brom-*n*-octyloxybenzol **198**

Die Darstellung erfolgte nach einer Vorschrift von Gray.²⁵⁸

Unter starkem Rühren wurde eine Lösung von 54.0 g 1-Brom-*n*-octan (0.280 mol) in 130 ml Aceton einer Mischung aus 48.0 g 4-Bromphenol (0.277 mol), 84.5 g Kaliumcarbonat (0.611 mol) und 480 ml Aceton zugetropft und anschließend solange refluxiert, bis das 4-Bromphenol nahezu vollständig umgesetzt war (3 Tage). Die Reaktionsmischung wurde auf Ether/Wasser gegossen und die wäßrige Phase mehrfach mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mehrfach mit Natronlauge (5 %) extrahiert, mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Fraktionierte Vakuumdestillation des Rückstandes ergab bei 150 °C und ca. 0.5 mbar 56.1 g 4-Brom-*n*-octyloxybenzol **198** (71 %).

Analytik: farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 7.34 (d, 3J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.75 (d, 3J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.89 (t, 3J = 6.5 Hz, 2 H, Ar-CH_2 -), 1.80 (pen, 3J = 6.5 Hz, 2 H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2$ -), 1.19 - 1.51 (m, 10 H, $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 0.86 (t, 3J = 6.7 Hz, 3 H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz) δ = 158.2, 132.1, 116.2, 112.5, 68.2, 31.8, 29.3, 29.2, 29.1, 26.0, 22.6, 14.1.

MS (70 eV): m/z (%) = 286/284 (M^+ , 10/10), 174/172 ($\text{M}^+ - \text{C}_8\text{H}_{16}$, 100/98).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{OBr}$ 284.0776, gefunden 284.0769.

I.2.3.19 4'-*n*-Octyloxy-4-nitrobiphenyl 149

Nach TAV I.2.3.13 wurden 5.14 g 4-Brom-*n*-octyloxybenzol **198** (18.0 mmol) mit 36.0 mmol *t*BuLi (1.5 M in Hexan) in 20 ml Ether in die Lithiumspezies überführt und mit 2.46 g trockenem ZnCl₂ (18.0 mmol) in insgesamt 36 ml THF transmetalliert. Die Kupplung mit 3.03 g 4-Bromnitrobenzol (15.0 mmol) und 0.174 g Pd(PPh₃)₄ (1 mol %) ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (Chloroform/PE 1:1) 3.98 g 4'-*n*-Octyloxy-4-nitrobiphenyl **149** (81 %). Zur Entfernung einer geringen Verunreinigung wurden 400 mg nochmals durch Flashchromatographie gereinigt.

Analytik: schwach gelber Feststoff, Fp. 48 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.24 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.67 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.55 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.98 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.99 (t, ³J = 6.6 Hz, 2 H, -OCH₂), 1.80 (pen, ³J = 6.6 Hz, 2 H, -OCH₂CH₂), 1.19 - 1.51 (m, 10 H, -(CH₂)₅CH₃), 0.87 (t, ³J = 6.6 Hz, 3 H, -CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 160.1, 147.3, 146.5, 130.8, 128.5, 127.0, 124.1, 115.2, 68.2, 31.8, 29.3, 29.2 (2 Signale), 26.0, 22.6, 14.1.

MS (70 eV): m/z (%) = 327 (M⁺, 49), 215 (M⁺ - C₈H₁₆, 100), 185 (M⁺ - C₈H₁₆ - NO, 58), 169 (M⁺ - C₈H₁₆ - NO₂, 48), 141 (51).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₂₀H₂₅NO₃ 327.1834, gefunden 327.1832.

I.2.3.20 4'-*n*-Octyloxy-4-aminobiphenyl 213

Nach TAV I.2.2.15 ergab die Reduktion von 1.64 g 4'-*n*-Octyloxy-4-nitrobiphenyl **149** (5.00 mmol) mit 5.64 g SnCl₂ · 2 H₂O (25.0 mmol) in 10 ml EtOH und 10 ml EE nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 3:1) 1.06 g 4'-*n*-Octyloxy-4-aminobiphenyl **213** (72 %).

Analytik: weißer Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 7.44 (d, ³J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.35 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.92 (d, ³J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.72 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.96 (t, ³J = 6.5 Hz, 2 H, -OCH₂), 3.65 (s_{br}, 2 H, -NH₂), 1.79 (Ψ_{pen}, 2 H, -OCH₂CH₂), 1.17 - 1.49 (m, 10 H, -(CH₂)₅CH₃), 0.89 (t, ³J = 6.7 Hz, 3 H, -CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 158.0, 145.2, 133.7, 131.5, 127.6, 127.4, 115.4, 114.7, 68.1, 31.8, 29.3 (2 Signale), 29.2, 26.1, 22.7, 14.1.

MS (70 eV): m/z (%) = 297 (M⁺, 49), 185 (M⁺ - C₈H₁₆, 100), 156 (6).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $C_{20}H_{27}NO$ 297.2093, gefunden 297.2091.

I.2.3.21 2-*tert*-Butylanisol **207**

Eine Mischung aus 11.5 g Natrium-*tert*-butanolat (0.120 mol), 15.0 g 2-*tert*-Butylphenol (0.100 mol) in 150 ml absolutem EtOH wurde mit 11.7 g Dimethylsulfat (0.093 mol) versetzt und unter gutem Rühren 5 Stunden refluxiert. Nach Austausch des Rückflußkühlers gegen eine Claisenbrücke wurde das EtOH abdestilliert, der Rückstand mit Ether verdünnt und mehrfach mit Natronlauge (2 N), dann mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und fraktionierend im Vakuum destilliert. Man erhielt bei 78 - 80 °C und 9 mbar 12.4 g 2-*tert*-Butylanisol **207** (84 %).

Analytik: farbloses Öl.

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 7.27 (d, 3J = 7.6 Hz, 1 H, H_{arom}), 7.17 (t, 3J = 7.8 Hz, 1 H, H_{arom}), m 6.92 - 6.84 (m, 2 H, H_{arom}), 3.82 (s, 3 H, CH_3), 1.38 (s, 9 H, -*t*Bu).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 158.5, 138.3, 127.0, 126.5, 120.3, 111.6, 54.9, 34.8, 29.7.

I.2.3.22 4-Brom-2-*tert*-butylanisol **201** (TAV: Bromierung mit $TBABr_3$)

Die Darstellung erfolgte nach einer Methode von Berthelot.²⁵⁹

Zu einer Lösung von 8.21 g 2-*tert*-Butylanisol **207** (50.0 mmol) in 30 ml DCM wurde bei 0 °C eine Lösung 24.11 g $TBABr_3$ ²⁶⁰ in 100 ml DCM getropft und bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde fünfmal mit Natronlauge (2 N) und mehrfach mit Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde fraktioniert destilliert (bei 3 mbar), wobei zuerst Edukt, dann ein Gemisch und schließlich das Produkt überging. Redestillation der letzten Fraktion im Kugelrohr ergab 3.60 g 4-Brom-2-*tert*-butylanisol **201** (30 %).ⁱ Die Bromierung nach der Methode von Caló²⁵⁷ liefert in diesem Fall wahrscheinlich höhere Ausbeuten.

Analytik: weißer Feststoff.

1H -NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) δ = 7.40 (d, 4J = 2.5 Hz, 1 H, H_{arom}), 7.26 (dd, 3J = 8.6 Hz, 4J = 2.5 Hz, 1 H, H_{arom}), 6.72 (d, 3J = 8.6 Hz, 1 H, H_{arom}), 3.80 (s, 3 H, $-CH_3$), 1.33 (s, 9 H, -*t*Bu).

ⁱ Bei der DC-Kontrolle fiel der schlechte Umsatz nicht auf, da Produkt und Edukt ganz ähnliche R_f -Werte haben.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 157.6, 140.7, 129.7, 129.5, 113.2, 112.9, 55.2, 35.0, 29.5. Die ^{13}C -NMR Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.²⁶¹

I.2.3.23 3'-*tert*-Butoxy-4'-methoxy-4-nitrobiphenyl 144

Nach TAV I.2.2.12 wurden 3.40 g 4-Brom-2-*tert*-butylanisol **201** (14.0 mmol) mit 15.4 mmol *n*BuLi (1.6 M in Hexan) in 20 ml THF in die Lithiumspezies überführt und mit 1.91 g trockenem ZnCl_2 (14.0 mmol, gelöst in 15 ml THF) transmetalliert. Die Kupplung mit 2.79 g 4-Iodnitrobenzol (11.2 mmol) und 0.200 g $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (~ 2 mol %) ergab nach Aufarbeitung 4.2 g Rohprodukt. Dieses wurde mit wenig kaltem PE gewaschen und der Rückstand durch Säulenchromatographie (PE/EE 10:1) gereinigt. Man erhielt 2.87 g 3'-*tert*-Butoxy-4'-methoxy-4-nitrobiphenyl **144** (90 %).

Analytik: Schwach gelbe Kristalle.

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz, CDCl_3): δ = 8.24 (d, ^3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.68 (d, ^3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.54 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1 H, H_{arom}), 7.46 (dd, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1 H, H_{arom}), 6.98 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1 H, H_{arom}), 3.90 (s, 3 H, $-\text{OCH}_3$), 1.43 (s, 9 H, $-t\text{Bu}$).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 159.4, 147.9, 146.4, 139.1, 130.5, 127.1, 126.1, 125.8, 124.0, 112.0, 55.2, 35.0, 29.6.

MS (70 eV): m/z (%) = 285 (M^+ , 55), 270 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 100), 242 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7$, 12), 212 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7 - \text{NO}$, 9), 165 (14).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ 285.1365, gefunden 285.1359.

I.2.4 4-Nitrobiphenyle und 4-Aminobiphenyle mit Dialkylaminosubstituenten

I.2.4.1 4',4-Dinitrobiphenyl 179

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von Ullmann.²⁶²

Eine Mischung aus 7.97 g 4-Iodnitrobenzol (32.0 mmol), 6 g Kupferbronze (95.0 mmol), 100 mg $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)$ und 10 ml trockenem DMF wurde unter Argon 2 Stunden bei 200 °C Ölbadtemperatur refluxiert. In die noch warme Reaktionsmischung gab man EE und extrahierte solange mit viel heißem EE, bis kein Produkt mehr in Lösung ging (UV-Kontrolle). Die organische Phase wurde mit Salzsäure (5 %) und Wasser (zweimal) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, zur Entfernung des feinverteilten Palladiums filtriert (Fritte D4) und das Lö-

sungsmittel abdestilliert, bis das Produkt anfang auszufallen. Kristallisation im Eisfach ergab 2.5 g 4',4-Dinitrobiphenyl **179** (64 %).

Analytik: schwach gelbe Nadeln, Fp. 136 °C, Lit. 137 °C.²⁶²

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.09 (dt, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.8 Hz, 4 H, H_{arom}), 7.67 (dt, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.8 Hz, 4 H, H_{arom}).

I.2.4.2 4'-Amino-4-nitrobiphenyl **153**

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an ein Verfahren von Cade.²⁶³

Zu einer kochenden Lösung von 2.80 g 4',4-Dinitrobiphenyl **179** (11.5 mmol) in 30 ml Ethanol tropfte man unter Rühren langsam eine Lösung von 2.1 g Natriumsulfid und 0.54 g Schwefel in 10 ml Wasser. Die Lösung wurde solange weiter erhitzt, bis das Edukt nahezu vollständig reagiert hatte (DC-Kontrolle, schon während der Zugabe des Reduktionsmittels beginnen, Produkt wird leicht überreduziert) und auf Eiswasser gegossen. Der abfiltrierte Niederschlag wurde zur Entfernung des gebildeten Benzidinsⁱ mehrfach mit kochendem Wasser gewaschen, dann in EE gelöst, über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Reinigung durch Säulenchromatographie (Chloroform) ergab 1.35 g 4'-Amino-4-nitrobiphenyl **153** (55 %).

Analytik: oranger Feststoff, Fp. 201 °C.

¹H-NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ = 8.22 (dt, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.69 (dt, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.49 (dt, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.78 (dt, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.97 (s_{br}, 2 H, -NH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 148.0, 147.6, 146.3ⁱⁱ, 128.5, 128.1, 126.4, 124.1, 115.2.

MS (70 eV): m/z (%) = 214 (M⁺, 100), 184 (M⁺ - NO, 7), 168 (M⁺ - NO₂, 36), 167 (37).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₂H₁₀N₂O₂ 214.0742, gefunden 214.0739.

I.2.4.3 N,N-Dimethyl-4'-amino-4-nitrobiphenyl **154**

Nach TAV I.2.2.12 wurden 3.00 g N,N-Dimethyl-4'-aminobrombenzol (15.0 mmol) mit 16.5 mmol *n*BuLi (1.6 M in Hexan) in 25 ml THF in die Lithiumspezies überführt und mit 2.04 g trockenem ZnCl₂ (15.0 mmol, gelöst in 10 ml THF) transmetalliert. Die Kupplung mit 3.11 g 4-Iodnitrobenzol (12.5 mmol) und 0.200 g Pd(PPh₃)₄ (~ 2 mol %) ergab nach Aufar-

ⁱ Vorsicht! Humankanzerogen!

ⁱⁱ Trotz Langzeitmessung Signal sehr schwach und daher unsicher.

beutung (statt EE wurde mit DCM extrahiert) und Reinigung durch Säulenchromatographie (Chloroform/PE 2:1)ⁱ 2.06 g N,N-Dimethyl-4'-amino-4-nitrobiphenyl **154** (68 %).

Analytik: orangerote Kristalle, Fp. 248 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.22 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.66 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.55 (d, ³J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.81 (d, ³J = 8.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.02 (s, 6 H, CH₃), 1.56 (s_{br}, 2 H, NH₂).

MS (70 eV): m/z (%) = 242 (M⁺, 100), 196 (M⁺ - NO₂, 20), 195 (19), 152 (21)

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₄H₁₄N₂O₂ 242.1055, gefunden 242.1056.

I.2.4.4 4-Brom-N,N-diethylanilin **215**

Die Darstellung erfolgte in Ansatz und Durchführung nach TAV I.2.3.16 aus N,N-Diethylanilin **214**. Fraktionierte Vakuumdestillation des Rohprodukts ergab 4.06 g 4-Brom-N,N-diethylanilin **215** (89 %).

Analytik: farblose Plättchen.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 7.26 (d, ³J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.53 (d, ³J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.31 (q, ³J = 7.1 Hz, 4 H, -CH₂-), 1.13 (t, ³J = 7.1 Hz, 6 H, -CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 146.8, 131.8, 113.5, 107.0, 44.4, 12.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 229/227 (M⁺, 36/37), 214/212 (M⁺ - CH₃, 97/100), 186/184 (M⁺ - C₃H₇, 17/26).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₀H₁₄NBr 227.0310, gefunden 227.0314.

I.2.4.5 N,N-Diethyl-4'-amino-4-nitrobiphenyl **155**

Nach TAV I.2.2.12 wurden 3.20 g 4-Brom-N,N-diethylanilin **215** (14.0 mmol) mit 15.5 mmol *n*BuLi (1.6 M in Hexan) in 22 ml THF in die Lithiumspezies überführt und mit 1.91 g trockenem ZnCl₂ (14.0 mmol, gelöst in 15 ml THF) transmetalliert. Die Kupplung mit 2.91 g 4-Iodnitrobenzol (11.7 mmol) und 0.404 g Pd(PPh₃)₄ (~ 3 mol %) ergab nach Aufarbeitung (statt EE wurde mit DCM extrahiert) und Reinigung durch Säulenchromatographie (Chloroform/PE 2:1) 2.77 g N,N-Diethyl-4'-amino-4-nitrobiphenyl **155** (88 %). Eine kleine Probe (250 mg) wurde für den Ames-Test nochmals chromatographisch (PE/EE 6:1) gereinigt.

Analytik: orangerote Kristalle, Fp. 148 - 149 °C.

ⁱ Pro 200 mg Substanz wurden 100 g Kieselgel benötigt.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.21 (d, 3J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.65 (d, 3J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.52 (d, 3J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.73 (d, 3J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.40 (q, 3J = 7.1 Hz, 4 H, $-\text{CH}_2-$), 1.19 (t, 3J = 7.1 Hz, 6 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 149.7, 148.8, 146.9, 129.3, 126.7, 125.7, 125.0, 113.0, 45.3, 13.2.

MS (70 eV): m/z (%) = 270 (M^+ , 37), 255 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 100), 209 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{NO}_2$, 12), 152 (22).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 270.1368, gefunden 270.1371.

I.2.4.6 N,N-Di-*iso*-propylanilin **219**

I) Aus N-*iso*-Propylanilin und *iso*-Propyliodid

Nach der Methode von Zander¹⁶⁵ wurden 13.52 g N-*iso*-Propylanilin (0.10 mol) und 20.39 g *iso*-Propyliodid (0.12 mol) miteinander vermischt und solange auf 100 °C erhitzt, bis das Edukt größtenteils reagiert hatte. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde mit Ether und Natronlauge (2 N) behandelt, die organische Phase abgetrennt, getrocknet und von Lösungsmittel am Rotationsverdampfer befreit. Fraktionierende Destillation ergab 11.52 g N,N-Di-*iso*-propylanilin **219** (65 %).

II) Aus LDA und Brombenzol

Die Darstellung erfolgte in Ansatz und Durchführung nach einer Vorschrift von Kauffmann.²⁶⁴ Zur Aufarbeitung wurde die wäßrige Phase mit Natronlauge alkalisch gemacht und mit Ether extrahiert. Nach Trocknung über MgSO_4 , Entfernung des Lösungsmittels und Vakuumdestillation (~ 100 °C bei 13 mbar) im Kugelrohrföfen erhielt man 3.10 g N,N-Di-*iso*-propylanilin **219** (69 %).

Analytik: gelbliches Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 7.22 - 7.14 (m, 2 H, H_{arom}), 6.95 - 6.71 (m, 3 H, H_{arom}), 3.75 (sep, 3J = 6.8 Hz, 2 H, $-\text{CH}-$), 1.19 (d, 3J = 6.8 Hz, 12 H, $-\text{CH}_3$). Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.²⁶⁵

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 148.0, 128.4, 119.5, 118.3, 47.6, 21.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 177 (M^+ , 59), 162 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 61), 134 (18), 120 ($\text{M}^+ - i\text{Pr} - \text{CH}_3$, 100).

I.2.4.7 4-Brom-N,N-di-*iso*-propylanilin **220**

Nach TAV I.2.3.22 wurden 3.00 g N,N-Di-*iso*-propylanilin **219** (16.9 mmol) mit 8.16 g TBABr_3 in insgesamt 70 ml DCM bromiert. Nach Aufarbeitung wurde das Rohprodukt im

Kugelrohrföhen bei 180 °C im Vakuum destilliert und ergab 3.98 g 4-Brom-N,N-di-*iso*-propylanilin **220** (92 %).

Analytik: farblose Flüssigkeit (wird im Kühlschrank fest).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 7.26 (d, 3J = 7.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.75 (d, 3J = 7.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.74 (sep, 3J = 6.6 Hz, 2 H, -CH-), 1.21 (d, 3J = 6.6 Hz, 12 H, - CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 147.1, 131.2, 120.3, 109.9, 47.6, 21.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 257/255 (M^+ , 15/15), 242/240 (M^+ - CH_3 , 82/85), 200/198 (M^+ - C_4H_9 , 68/100), 162 (24).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NBr}$ 255.0623, gefunden 255.0629.

I.2.4.8 N,N-Di-*iso*-propyl-4'-amino-4-nitrobiphenyl **156**

Nach TAV I.2.2.12 wurden 3.63 g 4-Brom-N,N-di-*iso*-propylanilin **220** (14.2 mmol) mit 15.6 mmol $n\text{BuLi}$ (1.6 M in Hexan) in 25 ml THF in die Lithiumspezies überführt und mit 1.93 g trockenem ZnCl_2 (14.16 mmol, gelöst in 15 ml THF) transmetalliert. Die Kupplung mit 2.938 g 4-Iodnitrobenzol (11.8 mmol) und einer Katalysatorlösung aus 0.123 g $\text{Pd}(\text{dba})_2$ und 200 mg Tris(2-furyl)phosphin in 3 ml THF ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (DCM/PE 1:1) 2.89 g N,N-Di-*iso*-propyl-4'-amino-4-nitrobiphenyl **156** (82 %). Eine kleine Probe (230 mg) wurde für den Ames-Test nochmals chromatographisch gereinigt.

Analytik: orangerote Kristalle, Fp. 123 - 125 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.24 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.68 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.52 (d, 3J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.73 (d, 3J = 9.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.93 (sep, 3J = 6.9 Hz, 2 H, -CH), 1.33 (d, 3J = 6.9 Hz, 12 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 148.9, 147.6, 145.7, 127.6, 125.9, 125.7, 124.1, 116.4, 47.4, 21.1.

MS (70 eV): m/z (%) = 298 (M^+ , 27), 283 (M^+ - CH_3 , 100), 241 (M^+ - C_4H_9 , 81), 195 (M^+ - C_4H_9 - NO_2 , 33), 152 (14).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ 298.1681, gefunden 298.1685.

I.2.5 Sonstige 4-Nitrobiphenyle und 4-Aminobiphenyle

I.2.5.1 N,N-Dimethyl-4-aminobiphenyl **91**

Zu einer Lösung von 2.72 g trockenem Zinkchlorid (20.0 mmol) in 40 ml THF tropfte man unter Argon bei 0 °C 19 mmol Phenyllithium (1.8 M in Pentan). Nach einstündigem Rühren wurden im Argongegenstrom 3.80 g 4-Brom-N,N-dimethylanilin (19.0 mmol) und 0.215 g $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ zugegeben und bei 45 °C über Nacht gerührt. Die schwarze Reaktionsmischung wurde am Rotationsverdampfer eingengt, mit Diethylether und Wasser versetzt, schwach alkalisiert und mit Wasser gewaschen. Die Etherphase wurde über MgSO_4 getrocknet, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand durch Säulenchromatographie (PE/DCM 4:1) gereinigt.ⁱ Man erhielt 3.00 g N,N-Dimethyl-4-aminobiphenyl **91** (80 %). Für den Ames-Test wurde ein Teil des Produkts aus Ethanol und anschließend aus PE umkristallisiert.

Analytik: farblose Plättchen.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2 , 300 MHz) δ = 7.53 (d, 3J = 7.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.47 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.36 (t, 3J = 7.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.22 (t, 3J = 7.8 Hz, 1 H, H_{arom}), 6.76 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 2.93 (s, 6 H, 2 CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 150.0, 141.2, 129.2, 128.6, 127.6, 126.2, 125.9, 112.7, 40.5.

MS (70 eV): m/z (%) = 197 (M^+ , 100), 196 (61), 181 (13), 153 (14), 152 (18).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}$ 197.1204, gefunden 197.1201.

I.2.5.2 N-Acetyl-4-aminobiphenyl **93**

Man tropfte zu einer Lösung von 1.30 g 4-Aminobiphenyl **2** (7.68 mmol) in 20 ml trockenem Pyridin 0.66 g Acetylchlorid (8.45 mmol) und refluxierte über Nacht bei 80 °C. Die abgekühlte Reaktionsmischung wurde auf Eiswasser gegossen, der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und in der Fritte mit warmen EE gelöst und abfiltriert (Saugflasche wechseln). Das Filtrat wurde mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und ergab 1.60 g N-Acetyl-4-aminobiphenyl **93** (99 %). Das bereits recht saubere Produkt wurde für den Ames-Test aus wässrigem EtOH (50 %) und danach aus reinem EtOH umkristallisiert.

ⁱ Vorsicht! Bei geringer Durchflußgeschwindigkeit zersetzte sich das Produkt teilweise und wurde schwarz. Als Feststoff ist das Produkt stabil.

Analytik: weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2 , 300 MHz) δ = 7.69 (s_{br} , 1 H, NH), 7.60 - 7.28 (m, 9 H, H_{arom}), 2.18 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 186.5, 140.4, 137.2, 137.1, 128.7, 127.5, 127.1, 126.8, 120.3, 24.5.

MS (70 eV): m/z (%) = 211 (M^+ , 47), 170 (10), 169 ($\text{M}^+ - \text{COCH}_3 + \text{H}$).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}$ 211.0997, gefunden 211.0999.

I.2.5.3 4'-Trifluormethylsulfonyloxy-4-nitrobiphenyl **141**

Zu einer Lösung 1.00 g 4'-Hydroxy-4-nitrobiphenyl **139** (4.65 mmol) in 12 ml trockenem Pyridin wurden bei RT 1.44 g Trifluormethylsulfonsäureanhydrid (5.12 mmol) getropft und über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit EE verdünnt, mehrfach mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie (Cyclohexan/EE 5:1) erhielt man 1.32 g 4'-Trifluormethylsulfonyloxy-4-nitrobiphenyl **141** (91 %).

Analytik: farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.31 (d, 3J = 9 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.74 - 7.65 (m, 4 H, H_{arom}), 7.40 (d, 3J = 9 Hz, 2 H, H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 149.9, 147.6, 145.5, 139.2, 129.3, 128.0, 124.3, 122.1, 118.8 (q, $^1J(\text{CF})$ = 317 Hz).ⁱ

MS (70 eV): m/z (%) = 347 (M^+ , 52), 214 ($\text{M}^+ - \text{SO}_2\text{CF}_3$, 100), 168 ($\text{M}^+ - \text{SO}_2\text{CF}_3 - \text{NO}_2$, 9), 156 (14), 139 (24).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{NSF}_3\text{O}_5$ 347.0075, gefunden 347.0080.

I.2.5.4 4'-Bromomethyl-4-nitrobiphenyl **125**

Eine Mischung aus 0.430 g 4'-Methyl-4-nitrobiphenyl **94** (2.02 mmol), 0.413 g NBS (2.32 mmol) und 20 mg AIBN in 15 ml trockenem, entgastem Tetrachlorkohlenstoff wurde unter Argon refluxiert, bis die DC-Kontrolle vollständigen Umsatz zeigte. Nach dem Abkühlen wurde das Succinimid abgesaugt, mit Tetrachlorkohlenstoff nachgewaschen und das Lösungsmittel aus den vereinigten Filtraten im schwachen Vakuum abdestilliert. Reinigung

ⁱ Trotz Langzeitmessung Signal sehr schwach und daher unsicher.

durch Säulenchromatographie (PE/EE 7:1) ergab 0.531 g 4'-Brommethyl-4-nitrobiphenyl **125** (90 %).

Analytik: farbloser Feststoff, Fp. 76 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 8.28 (d, 3J = 8.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.78 - 7.46 (m, 6 H, H_{arom}), 4.53 (s, 2 H, $-\text{CH}_2$).

MS (70 eV): m/z (%) = 293/291 (M^+ , 4/4), 212 ($\text{M}^+ - \text{Br}$, 100), 166 (21), 165 (30).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrNO}_2$ 290.9895, gefunden 290.9886.

I.2.5.5 4'-Hydroxymethyl-4-nitrobiphenyl **122**

0.300 g 4'-Brommethyl-4-nitrobiphenyl **125** (1.03 mmol) wurden in 35 ml wässrigem Aceton (70 %) gelöst und zu einer Lösung von 0.530 g Silbernitrat (3.12 mmol) in 15 ml wässrigem Aceton (50 %) bei 50 °C getropft. Die Mischung wurde bei 50 °C drei Stunden gerührt, mit 50 ml Wasser verdünnt und mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 4:1) ergab 0.115 g 4'-Hydroxymethyl-4-nitrobiphenyl **122** (49 %).

Analytik: farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (THF, 200 MHz) δ = 8.28 (d, 3J = 8.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.87 (d, 3J = 8.0 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.70 (d, 3J = 8.1 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.47 (d, 3J = 8.1 Hz, 2 H, H_{arom}), 4.67 (d, 3J = 5.6 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2$), 3.01 (t, 3J = 5.6 Hz, 1 H, $-\text{OH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (THF, 50 MHz) δ = 148.5, 145.2, 138.2, 131.1, 128.7, 128.2, 128.1, 125.0, 64.6.

MS (70 eV): m/z (%) = 229 (M^+ , 100), 182 ($\text{M}^+ - \text{H}$, NO_2 , 6), 152 ($\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NO}_2$, 39).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 229.0739, gefunden 229.0740.

I.2.5.6 4'-(1-Hydroxyethyl)-4-nitrobiphenyl **123**

Zu einer Lösung von 2.41 g 4'-Acetyl-4-nitrobiphenyl²⁴⁸ (10.0 mmol) in 20 ml Methanol wurden unter Rühren portionsweise 0.4 g Natriumborhydrid zugegeben und 45 Min. bei RT nachgerührt. Dann versetzte man mit Wasser (Zersetzung des überschüssigen Reduktionsmittels), schüttelte mit Ether aus, wusch die Etherphase neutral und trocknete über MgSO_4 . Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 1:1) ergab 2.06 g 4'-(1-Hydroxyethyl)-4-nitrobiphenyl **123** (85 %).

Analytik: zitronengelbe Kristalle.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.32 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.76 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.65 (d, 3J = 8.2 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.54 (d, 3J = 8.2 Hz, 2 H, H_{arom}), 5.01 (m, 1 H, -CH-), 1.92 (d, 3J = 3.5 Hz, 1 H, -OH), 1.58 (d, 3J = 6.4 Hz, 3 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (THF, 50 MHz) δ = 147.4, 147.1., 146.8, 138.0, 127.8, 127.6, 126.3, 124.0, 70.1, 25.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 243 (M^+ , 100), 196 ($\text{M}^+ - \text{H}$, NO_2 , 4), 152 ($\text{M}^+ - \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{NO}_2$, 45).

I.2.6 2-Nitrofluorene und 2-Aminofluorene

I.2.6.1 2-Methyl-7-nitrofluoren 108 (Stille-Kupplung)

In einem 100 ml Stickstoffkolben mit Überdruckventil wurde unter Argon eine gerührte Mischung aus 1 ml SnMe_4 , 1.00 g 2-Brom-7-nitrofluoren (3.45 mmol), 154 mg $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (6 mol %) in 10 ml DMF und 5 ml Toluol (jeweils entgast) 19 Stunden auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die schwarze Reaktionsmischung (durch ausgefallenes Palladium) auf Wasser gegossen und mehrfach mit EE extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Reinigung durch Säulenchromatographie (Cyclohexan/DCM 2:1) ergab 0.653 g 2-Methyl-7-nitrofluoren **108** (84 %).

Die analytischen Daten sind bei I.2.6.12 angegeben.

I.2.6.2 4-(1-Adamantyl)brombenzol 187

Unter Eiskühlung wurden 2.46 g Brom (15.4 mmol) zu einer Lösung von 1-Phenyladamantan **186** (2.97 g, 14.0 mmol, hergestellt nach einem Verfahren von Stetter¹⁴¹) und 0.3 ml Pyridin in 5 ml CCl_4 getropft. Nach 46-stündigem Rühren bei 30 - 35 °C unter Lichtausschluss entfernte man das überschüssige Brom durch Zugabe von Natriumhydrogensulfidlösung und extrahierte die Mischung mit CCl_4 . Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Reinigung durch Säulenchromatographie (PE, 300 g Kieselgel) ergab 2.45 g 4-(1-Adamantyl)brombenzol **187** (60 %). Zurückgewonnenes 1-Phenyladamantan **186** wurde für eine weitere Bromierung eingesetzt.

Analytik: farbloser Feststoff, Fp. 99-101 °C, Lit. 101 °C.²⁶⁶

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 300 MHz) δ = 1.75 (m, 6 H, ad), 1.86 (m, 6 H, ad), 2.08 (m, 3 H, ad), 7.21 (d, 2 H, ^3J = 8.7 Hz, H_{arom}), 7.41 (d, 2 H, ^3J = 8.7 Hz, H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 75 MHz) δ = 28.9, 36.1, 36.7, 43.1, 119.2, 126.8, 131.1, 150.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 290/292 (M^+ , 56), 233/235 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9$, 22), 154 (234 – Br, 100).

I.2.6.3 2-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester **244**

Eine Mischung aus 19.7 g 2-Brom-5-nitrobenzoesäure (80.0 mmol), 13.0 g trockenem Methanol (407 mmol) und 0.8 ml 98% H_2SO_4 wurde 16 h unter Rückfluß erhitzt. Die gekühlte Mischung wurde in DCM gelöst und mit 2 N Natronlauge neutralisiert. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Umkristallisation aus EE ergab 18.7 g 2-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester **244** (90%).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 80-81 °C, Lit. 82 °C.²⁶²

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 300 MHz) δ = 3.97 (s, 3 H, OCH_3), 7.85 (d, ^3J = 8.7 Hz, 1 H, H_{arom}), 8.15 (dd, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 2.7 Hz, 1 H, H_{arom}), 8.63 (d, ^3J = 2.7 Hz, 1 H, H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 75 MHz) δ = 52.9, 126.1, 126.4, 128.9, 133.1, 135.5, 146.8, 164.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 259/261 (M^+ , 55), 229 (100), 228 (97), 182/184 ($\text{M}^+ - \text{OCH}_3$, – NO_2 , 43).

I.2.6.4 2-(4-Methylphenyl)-5-nitrobenzoesäuremethylester **255**

Nach TAV I.2.3.13 wurden 2.59 g 4-Bromtoluol (15.0 mmol) in 20 ml Diethylether bei -78 °C durch Zugabe von 30.0 mmol $t\text{BuLi}$ (1.5 M in Pentan) in die Lithium-Spezies überführt (schwache Gelbfärbung) und mit trockenem ZnCl_2 (2.04 g, 15.0 mmol) in insgesamt 35 ml THF transmetalliert. Die Kupplung mit 2-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester **244** (3.37 g, 13.0 mmol), 0.174 g $\text{Pd}(\text{dba})_2$ und 0.166 g dppf in 50 ml THF (18 h bei RT) ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE, 7:1) 2.47 g 2-(4-Methylphenyl)-5-nitrobenzoesäuremethylester **255** (70 %).

Analytik: gelblicher Feststoff, Fp. 55-57 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 300 MHz) δ = 2.39 (s, 3 H, CH_3), 3.72 (s, 3 H, OCH_3), 7.20 (d, 2 H, ^3J = 8.3 Hz, H_{arom}), 7.24 (d, 2 H, ^3J = 8.3 Hz, H_{arom}), 7.53 (d, 1 H, ^3J = 8.5 Hz, H_{arom}), 8.27 (dd, 1 H, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 2.5 Hz, H_{arom}), 8.58 (d, 1 H, ^4J = 2.4 Hz, H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 21.2, 52.5, 125.1, 125.6, 128.0, 129.2, 131.9, 132.0, 136.1, 138.6, 146.6, 148.7, 167.0.

MS (70 eV): m/z (%) = 271 (M^+ , 100), 254 ($M^+ - OH$, 4), 240 ($M^+ - OCH_3$, 90), 194 ($240 - NO_2$, 38), 165 (58).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $C_{15}H_{13}NO_4$ 271.0845, gefunden 271.08144.

I.2.6.5 2-(4-*tert*-Butylphenyl)-5-nitrobenzoesäuremethylester **250**

Nach TAV I.2.3.13 wurde 4-Brom-*tert*-butylbenzol (3.19 g, 15.0 mmol) in 30 ml Diethylether bei -78 °C durch Zugabe von 30.0 mmol *t*BuLi (1.5 M in Pentan) in die Lithium-Spezies überführt (schwache Gelbfärbung) und mit trockenem $ZnCl_2$ (2.04 g, 15.0 mmol) in insgesamt 30 ml THF transmetalliert. Die Kupplung mit 2-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester **244** (3.37 g, 13.0 mmol), 0.175 g $Pd(dba)_2$ und 0.160 g dppf in 50 ml THF (18 h bei RT) ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE, 12:1) 2.97 g 2-(4-*tert*-Butylphenyl)-5-nitrobenzoesäuremethylester **250** (73 %).

Analytik: gelblicher Feststoff, 61-63 °C.

1H -NMR ($CDCl_3$; 300 MHz) δ = 1.34 (s, 9 H, *t*Bu), 3.71 (s, 3 H, OCH_3), 7.25 (d, 2 H, $^3J = 8.5$ Hz, H_{arom}), 7.44 (d, 2 H, $^3J = 8.5$ Hz, H_{arom}), 7.61 (d, 1 H, $^3J = 8.5$ Hz, H_{arom}), 8.33 (dd, 1 H, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, H_{arom}), 8.64 (d, 1 H, $^4J = 2.5$ Hz, H_{arom}).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$; 75 MHz) δ = 31.3, 34.7, 52.5, 125.1, 125.4, 125.6, 127.9, 131.9, 132.0, 136.0, 146.6, 148.6, 151.8, 167.2.

MS (70 eV): m/z (%) = 313 (M^+ , 20), 298 ($M^+ - CH_3$, 100), 268 ($298 - NO$, 8).¹⁸

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $C_{18}H_{19}NO_4$ 313.1314, gefunden 313.1298.

I.2.6.6 2-(4-(1-Adamantyl)phenyl)-5-nitrobenzoesäuremethylester **257**

Nach TAV I.2.3.13 wurde 4-(1-Adamantyl)brombenzol (3.15 g, 10.8 mmol) in 40 ml Diethylether bei -78 °C durch Zugabe von 21.6 mmol *t*BuLi (1.5 M in Pentan) in die Lithium-Spezies überführt (schwache Gelbfärbung) und mit trockenem $ZnCl_2$ (1.46 g, 10.8 mmol) in insgesamt 30 ml THF transmetalliert. Die Kupplung mit 2-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester **244** (2.56 g, 9.8 mmol), 0.060 g $Pd(dba)_2$ und 0.057 g dppf in 20 ml THF (18 h bei RT) ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (Cyclohexan/ CH_2Cl_2 1:1) 2.45 g 2-(4-(1-Adamantyl)phenyl)-5-nitrobenzoesäuremethylester **257** (64 %).

Analytik: gelblicher Feststoff, Fp. 75-77 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 300 MHz) δ = 1.77 (m, 6 H, ad), 1.93 (m, 6 H, ad), 2.10 (m, 3 H, ad), 3.70 (s, 3 H, OCH_3), 7.26 (d, 2 H, 3J = 8.5 Hz, H_{arom}), 7.42 (d, 2 H, 3J = 8.5 Hz, H_{arom}), 7.55 (d, 1 H, 3J = 8.5 Hz, H_{arom}), 8.32 (dd, 1 H, 3J = 8.5 Hz, 4J = 2.5 Hz, H_{arom}), 8.58 (d, 1 H, 4J = 2.4 Hz, H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 100 MHz) δ = 28.9, 36.3, 36.8, 43.1, 52.5, 125.0, 125.0, 125.5, 127.9, 131.9, 132.1, 136.0, 146.6, 148.6, 152.0, 167.6.

MS (70 eV): m/z (%) = 391 (M^+ , 100), 334 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9$, 15), 302 (334 – CH_3OH , 75), 256 (302 – NO_2 , 20).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ 391.1784, gefunden 391.1792.

I.2.6.7 5-Nitro-2-(4-trifluormethylphenyl)benzoesäuremethylester 258

Nach TAV I.2.3.13 wurde 4-Brom-1-trifluormethylbenzol (11.3 mmol, 2.54 g) in 40 ml Diethylether bei $-100\text{ }^\circ\text{C}$ durch Zugabe von 22.6 mmol $t\text{BuLi}$ (1.5 M in Pentan) in die Lithium-Spezies überführt (Dunkelfärbung) und mit trockenem ZnCl_2 (1.53 g, 11.3 mmol) in insgesamt 30 ml THF transmetalliert. Die Kupplung mit 2-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester **244** (2.60 g, 10.0 mmol), 0.120 g $\text{Pd}(\text{dba})_2$ und 0.114 g dppf in 20 ml THF (18 h bei RT) ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 8:1 \Rightarrow 4:1) 2.47 g 5-Nitro-2-(4-trifluormethylphenyl)benzoesäuremethylester **258** (76 %).

Analytik: gelbliche Kristalle, Fp. 90-91 $^\circ\text{C}$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 300 MHz) δ = 3.73 (s, 3 H, OCH_3), 7.41 (d, 2 H, 3J = 8.1 Hz, H_{arom}), 7.53 (d, 2 H, 3J = 8.5 Hz, H_{arom}), 7.69 (d, 1 H, 3J = 8.1 Hz, H_{arom}), 8.39 (dd, 1 H, 3J = 8.5 Hz, 4J = 2.2 Hz, H_{arom}), 8.76 (d, 1 H, 4J = 2.2 Hz, H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 75 MHz) δ = 52.4, 123.9 (q, $^1J(\text{CF})$ = 272.0 Hz), 125.10 (q, $^3J(\text{CF})$ = 3.8 Hz), 125.3, 125.8, 130.2 (q, $^2J(\text{CF})$ = 32.2 Hz), 131.6, 131.9, 142.7, 147.1, 147.3, 165.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 325 (M^+ , 60), 294 ($\text{M}^+ - \text{OCH}_3$, 100), 248 (294 – NO_2 , 31), 228 (25).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{NO}_4\text{F}_3$ 325.0562, gefunden 325.0564.

I.2.6.8 2-(4-Methylphenyl)-5-nitrobenzylalkohol 260 (TAV: Reduktion mit LiBH_4)

Zu einer gekühlten Lösung (0 $^\circ\text{C}$) von 2-(4-Methylphenyl)-5-nitrobenzoesäuremethylester **255** (1.80 g, 6.65 mmol) und 0.80 ml Methanol (19.7 mmol) in 40 ml Diethylether unter Argon wurden tropfenweise mit einer Spritze 9.96 ml LiBH_4 -Lösung (19.9 mmol, 2 M in THF) zugegeben. Dabei entwickelte sich ein Gas. Nach 1.5 h Rühren wurde die klare Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und solange weitergerührt, bis das Edukt nach DC-Kontrolle voll-

ständig umgesetzt war. Die Reaktion wurde mit Wasser gequench und mit 1 M HCl bei 0 °C (Gasentwicklung) neutralisiert. Die Mischung wurde mit Ether extrahiert, die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Reinigung durch Flash-Chromatographie (PE/EE 3:1) ergab 1.39 g 2-(4-Methylphenyl)-5-nitrobenzylalkohol **260** (86 %).

Analytik: farbloser Feststoff, Fp. 76 °C.

¹H-NMR (CDCl₃; 300 MHz) δ = 2.08 (t, 1 H, ³J = 5.5 Hz, OH), 2.40 (s, 3 H, CH₃), 4.61 (d, 2 H, ³J = 5.4 Hz, CH₂), 7.20 (d, 2 H, ³J = 8.1 Hz, H_{arom}), 7.25 (d, 2 H, ³J = 8.1 Hz, H_{arom}), 7.38 (d, 1 H, ³J = 8.4 Hz, H_{arom}), 8.13 (dd, 1 H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H_{arom}), 8.45 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 21.2, 62.3, 122.2, 122.9, 128.5, 129.3, 130.9, 135.6, 138.4, 140.1, 147.4 (2 Signale).

MS (70 eV): m/z (%) = 243 (M⁺, 100), 225 (M⁺ – H₂O, 26), 179 (225 – NO₂, 60).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₄H₁₃NO₃ 243.0895, gefunden 243.0897.

I.2.6.9 2-(4-*tert*-Butylphenyl)-5-nitrobenzylalkohol **261**

Nach TAV I.2.6.8 wurden 1.35 g 2-(4-*tert*-Butylphenyl)-5-nitrobenzoesäuremethylester **250** (4.30 mmol) in 60 ml Ether mit 0.26 ml Methanol und 3.23 ml LiBH₄-Lösung (6.45 mmol, 2 M in THF) reduziert. Aufarbeitung ergab 1.21 g 2-(4-*tert*-Butylphenyl)-5-nitrobenzylalkohol **261** (99 %).

Analytik: farbloser Feststoff, Fp. 97-98 °C.

¹H-NMR (CDCl₃; 300 MHz) δ = 1.38 (s, 9 H, *t*Bu), 1.86 (s, br, 1 H, OH), 4.64 (s, 2 H, CH₂), 7.25 (d, 2 H, ³J = 8.7 Hz, H_{arom}), 7.40 (d, 2 H, ³J = 8.5 Hz, H_{arom}), 7.46 (d, 1 H, ³J = 8.5 Hz, H_{arom}), 8.15 (dd, 1 H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, H_{arom}), 8.47 (d, 1 H, ⁴J = 2.4 Hz, H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 31.3, 34.7, 62.4, 122.3, 123.0, 125.6, 128.4, 131.0, 135.6, 140.1, 147.4, 151.6.

MS (70 eV): m/z (%) = 285 (M⁺, 27), 270 (M⁺ – CH₃, 100), 268 (M⁺ – OH, 39), 254 (11), 224 (270 – NO₂, 16).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₇H₁₉NO₃ 285.1365, gefunden 285.1362.

I.2.6.10 2-(4-(1-Adamantyl)phenyl)-5-nitrobenzylalkohol **262**

Nach TAV I.2.6.8 wurden 1.44 g 2-(4-(1-Adamantyl)phenyl)-5-nitrobenzoesäuremethylester **257** (3.68 mmol) in 60 ml Ether und 10 ml THF mit 0.44 ml Methanol und 2.80 ml LiBH₄-

Lösung (5.79 mmol, 2 M in THF) reduziert. Aufarbeitung ergab 1.21 g 2-(4-(1-Adamantylphenyl)-5-nitrobenzylalkohol **262** (90 %).

Analytik: farbloser Feststoff, Fp. 139-140 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2 ; 200 MHz) δ = 1.81 (m, 6 H, ad), 1.97 (m, 6 H, ad), 2.00 (s, br, 1 H, OH), 2.12 (m, 3 H, ad), 4.69 (s, 2 H, CH_2), 7.29 (d, 2 H, ^3J = 8.1 Hz, H_{arom}), 7.43 (d, 1 H, ^3J = 8.1 Hz, H_{arom}), 7.47 (d, 2 H, ^3J = 8.4 Hz, H_{arom}), 8.15 (dd, 1 H, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 2.4 Hz, H_{arom}), 8.45 (d, 1 H, ^4J = 2.4 Hz, H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2 ; 75 MHz) δ = 29.2, 36.3, 36.8, 43.2, 62.3, 122.2, 122.8, 125.2 (2 Signale), 128.6 (2 Signale), 131.0, 135.8, 140.5, 147.5 (2 Signale), 151.9.

MS (70 eV): m/z (%) = 363 (M^+ , 56), 306 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9$, 11), 288 (306 – H_2O , 4), 242 (288 – NO_2 , 44).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ 363.1834, gefunden 363.1839.

I.2.6.11 5-Nitro-2-(4-trifluormethylphenyl)benzylalkohol **263**

Nach TAV I.2.6.8 wurden 1.56 g 2-(4-(1-Adamantylphenyl)-5-nitrobenzoesäuremethylester **258** (4.79 mmol) in 25 ml Ether mit 0.29 ml Methanol und 3.60 ml LiBH_4 -Lösung (7.19 mmol, 2 M in THF) reduziert. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE 3:1) ergab 1.31 g 2-(4-(1-Adamantylphenyl)-5-nitrobenzylalkohol **263** (92 %).

Analytik: farbloser Feststoff, Fp. 85-86 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 300 MHz) δ = 2.03 (s, br, 1 H, OH), 4.64 (s, 2 H, CH_2), 7.41 (d, 1 H, ^3J = 8.4 Hz, H_{arom}), 7.47 (d, 2 H, ^3J = 8.1 Hz, H_{arom}), 7.72 (d, 2 H, ^3J = 8.1 Hz, H_{arom}), 8.19 (dd, 1 H, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 2.5 Hz, H_{arom}), 8.49 (d, 1 H, ^4J = 2.5 Hz, H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 100 MHz) δ = 62.1, 122.5, 123.3, 123.9 (q, $^1\text{J}(\text{CF})$ = 272.0 Hz), 125.7 (q, $^3\text{J}(\text{CF})$ = 3.8 Hz), 129.2, 130.7 (q, $^2\text{J}(\text{CF})$ = 32.5 Hz), 130.8, 140.1, 142.2, 145.9, 148.0.

MS (70 eV): m/z (%) = 297 (M^+ , 100), 279 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$, 39), 251 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2$, 25), 233 (279 – NO_2 , 78).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_3\text{F}_3$ 297.0613, gefunden 297.0603.

I.2.6.12 7-Methyl-2-nitrofluoren **108** (TAV: Fluoren-Cyclisierung)

In eine Mischung aus 5.5 g PPA in 19 ml Methansulfonsäure und 40 ml CHCl_3 wurden 0.850 g 2-(4-Methylphenyl)-5-nitrobenzylalkohol **260** (3.49 mmol) eingebracht. Die homogene Lösung wurde unter Rühren solange unter Rückfluß erhitzt, bis die DC-Kontrolle vollständigen Umsatz zeigte. Nach Zugabe von 100 ml CHCl_3 wurde die Mischung mit verdünnter Natronlauge unter Eiskühlung vorsichtig neutralisiert. Die organische Phase wurde mehrfach mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lö-

reinigungsmittel befreit. Reinigung durch Säulenchromatographie (Cyclohexan/DCM 2:1) ergab 0.597 g 7-Methyl-2-nitrofluoren **108** (76 %).

Analytik: schwach gelber Feststoff, Fp. 180-182 °C, Lit. 180-181 °C.¹⁶⁹

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 2.45 (s, 3 H, CH₃), 3.93 (s, 2 H, CH₂), 7.27 (d, 1 H, ³J = 7.8 Hz, H_{arom}), 7.41 (Ψs, 1 H, H_{arom}), 7.73 (d, 1 H, ³J = 7.8 Hz, H_{arom}), 7.79 (d, 1 H, ³J = 8.4 Hz, H_{arom}), 8.26 (dd, 1 H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, H_{arom}), 8.35 (Ψs, 1 H, H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ = 21.8, 36.8, 119.4, 120.4, 121.1, 123.1, 126.1, 128.4, 136.9, 139.2, 143.7, 145.2, 146.4, 148.2.

MS (70 eV): m/z (%) = 225 (M⁺, 95), 179 (M⁺ – NO₂, 98), 178 (179 – H, 100).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₄H₁₁NO₂ 225.0790, gefunden 225.0796.

I.2.6.13 7-tert-Butyl-2-nitrofluoren **109**

Nach TAV I.2.6.12 wurden 0.623 g 2-(4-tert-Butylphenyl)-5-nitrobenzylalkohol **261** (2.18 mmol) mit 3.7 g PPA in 12 ml Methansulfonsäure und 40 ml CHCl₃ cyclisiert. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (Cyclohexan/DCM 2:1) ergab 0.420 g 7-tert-Butyl-2-nitrofluoren **109** (72 %).

Analytik: gelblicher Feststoff, Fp. 189-191 °C (subl.).

¹H-NMR (CDCl₃; 300 MHz) δ = 1.37 (s, 9 H, tBu), 3.96 (s, 2 H, CH₂), 7.49 (dd, 1 H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, H_{arom}), 7.64 (Ψs, 1 H, H_{arom}), 7.77 (d, 1 H, ³J = 8.1 Hz, H_{arom}), 7.81 (d, 1 H, ³J = 8.4 Hz, H_{arom}), 8.26 (dd, 1 H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, H_{arom}), 8.36 (Ψs, 1 H, H_{arom}).

¹³C-NMR (CDCl₃; 75 MHz) δ = 31.5, 35.1, 37.0, 119.5, 120.4, 120.9, 122.3, 123.1, 124.8, 136.9, 144.0, 144.9, 146.5, 148.2, 152.6.

MS (70 eV): m/z (%) = 267 (M⁺, 28), 252 (M⁺ – CH₃, 100), 206 (252 – NO₂, 15).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₆H₁₇NO₂ 267.1259, gefunden 267.1258.

I.2.6.14 7-(1-Adamantyl)-2-nitrofluoren **110**

Nach TAV I.2.6.12 wurden 0.974 g 2-(4-(1-Adamantylphenyl)-5-nitrobenzylalkohol **262** (2.68 mmol) mit 4.6 g PPA in 14 ml Methansulfonsäure und 40 ml CHCl₃ cyclisiert. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (Cyclohexan/DCM 2:1) ergab 0.638 g 7-(1-Adamantyl)-2-nitrofluoren **110** (69 %).

Analytik: gelblicher Feststoff, Fp. >230 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 1.79 (m, 6 H, ad), 1.96 (m, 6 H, ad), 2.12 (m, 3 H, ad), 3.96 (s, 2 H, CH_2), 7.46 (Ψd , 1 H, ^3J = 8.6 Hz, H_{arom}), 7.61 (Ψs , 1 H, H_{arom}), 7.79 (d, 1 H, ^3J = 8.2 Hz, H_{arom}), 7.80 (d, 1 H, ^3J = 8.4 Hz, H_{arom}), 8.26 (dd, 1 H, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 2.1 Hz, H_{arom}), 8.36 (Ψs , 1 H, H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 100 MHz) δ = 26.9, 28.9, 36.7, 37.0, 43.3, 119.5, 120.4, 120.9, 121.9, 123.2, 124.4, 137.0, 144.0, 145.0, 146.4, 148.3, 152.9.

MS (70 eV): m/z (%) = 345 (M^+ , 100), 288 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9$, 38), 251 (21), 242 ($288 - \text{NO}_2$, 48), 135 (33).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ 345.1729, gefunden 345.1728.

I.2.6.15 2-Nitro-7-trifluormethylfluoren **129**

1.00 g 2-(4-Trifluormethylphenyl)-5-nitrobenzylalkohol **263** (3.36 mmol) wurden in 5 ml CHCl_3 gelöst und mit 11 g PPA versetzt. Die Mischung wurde unter Argon unter starkem Rühren 16 h unter Rückfluß erhitzt. Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (Cyclohexan/DCM 3:1) ergab 0.431 g 2-Nitro-7-trifluormethylfluoren **129** (46 %).

Analytik: farbloser Feststoff, Fp. 180-182 °C (subl.).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 4.10 (s, 2 H, CH_2), 7.71 (Ψd , 1 H, ^3J = 8.6 Hz, H_{arom}), 7.86 (Ψs , 1 H, H_{arom}), 7.92 (d, 1 H, ^3J = 8.8 Hz, H_{arom}), 7.95 (d, 1 H, ^3J = 8.8 Hz, H_{arom}), 8.32 (dd, 1 H, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 1.8 Hz, H_{arom}), 8.43 (Ψs , 1 H, H_{arom}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 100 MHz) δ = 37.0, 120.6, 120.8, 121.5, 122.3, 123.3 (q $^3\text{J}(\text{CF})$ = 3.8 Hz), 124.2 (q $^1\text{J}(\text{CF})$ = 272.4 Hz), 124.7 (q $^3\text{J}(\text{CF})$ = 3.7 Hz), 130.6 (q $^2\text{J}(\text{CF})$ = 32.3 Hz), 142.7, 144.5, 144.9, 146.3, 147.6.

MS (70 eV): m/z (%) = 279 (M^+ , 92), 262 (42), 249 ($\text{M}^+ - \text{NO}$, 18), 233 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2$, 100).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{NO}_2\text{F}_3$ 279.0508, gefunden 279.0503.

I.2.6.16 2-Amino-7-methylfluoren **119**

Nach TAV I.2.2.15 wurden 0.420 g 2-Nitro-7-methylfluoren **108** (1.86 mmol) mit 2.10 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (9.32 mmol) in 15 ml EtOH und 15 ml EE reduziert (10 Stunden). Aufarbeitung und Reinigung durch Flashchromatographie (PE/EE 2:1) ergab 0.348 g 2-Amino-7-methylfluoren **119** (96%).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 106-107 °C, Lit. 105-106 °C.¹⁶⁹

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2 ; 300 MHz) δ = 2.40 (s, 3 H, CH_3), 3.75 (s, 2 H, CH_2), 3.71-3.79 (s, br, 2 H, NH_2), 6.67 (dd, 1 H, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 2.1 Hz, H_{arom}), 6.84 (Ψs , 1 H, H_{arom}), 7.13 (Ψd , 1 H, ^3J = 7.7 Hz, H_{arom}), 7.30 (Ψs , 1 H, H_{arom}), 7.51 (d, 1 H, ^3J = 8.1 Hz, H_{arom}), 7.52 (d, 1 H, ^3J = 7.7 Hz, H_{arom}).

^{13}C -NMR (CD_2Cl_2 ; 75 MHz) δ = 21.7, 37.1, 112.1, 114.1, 118.6, 120.6, 126.0, 127.8, 133.2, 135.3, 140.0, 143.1, 145.6, 146.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 195 (M^+ , 100), 180 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 47), 165 ($\text{M}^+ - \text{NH}$, 12), 152 (13).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}$ 315.1048, gefunden 315.1042.

I.2.6.17 2-Amino-7-*tert*-butylfluoren 120

Nach TAV I.2.2.15 wurden 0.400 g 2-Nitro-7-*tert*-butylfluoren **109** (1.50 mmol) mit 1.70 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (7.19 mmol) in 20 ml EtOH und 20 ml EE reduziert (10 Stunden). Aufarbeitung und Reinigung durch Flashchromatographie (CHCl_3) ergab 0.327 g 2-Amino-7-*tert*-butylfluoren **120** (92%).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 155 - 157 °C (subl.).

^1H -NMR (CDCl_3 ; 300 MHz) δ = 1.35 (s, 9 H, *t*Bu), 3.40-3.90 (s, br, 2 H, NH_2), 3.78 (s, 2 H, CH_2), 6.67 (dd, 1 H, $^3\text{J} = 8.1 \text{ Hz}$, $^4\text{J} = 2.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 6.85 (Ψs , 1 H, H_{arom}), 7.34 (Ψd , 1 H, $^3\text{J} = 8.1 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.50 (Ψs , 1 H, H_{arom}), 7.51 (d, 1 H, $^3\text{J} = 8.1 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.55 (d, 1 H, $^3\text{J} = 8.1 \text{ Hz}$, H_{arom}).

^{13}C -NMR (CDCl_3 ; 75 MHz) δ = 31.6, 34.7, 36.9, 111.9, 113.9, 118.1, 120.3, 121.7, 123.7, 133.1, 139.5, 142.2, 145.2, 145.3, 148.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 237 (M^+ , 89), 222 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 100), 193 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_5$, 22), 180 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9$, 33).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}$ 237.1517, gefunden 237.1515.

I.2.6.18 7-(1-Adamantyl)-2-aminofluoren 121

Nach TAV I.2.2.15 wurden 0.300 g 2-Nitro-7-(1-adamantyl)fluoren **110** (0.868 mmol) mit 0.980 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (4.32 mmol) in 30 ml EtOH und 30 ml EE reduziert (10 Stunden). Aufarbeitung und Reinigung durch Flashchromatographie (PE/EE 5:2) ergab 0.246 g 2-Amino-7-(1-adamantyl)fluoren **121** (90%).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 228 - 230 °C.

^1H -NMR (CDCl_3 ; 300 MHz) δ = 1.77 (m, 6 H, ad), 1.95 (m, 6 H, ad), 2.09 (m, 3 H, ad), 3.77 (s, 2 H, CH_2), 3.70-3.79 (s, br, 2 H, NH_2), 6.67 (dd, 1 H, $^3\text{J} = 8.1 \text{ Hz}$, $^4\text{J} = 2.1 \text{ Hz}$, H_{arom}), 6.85 (Ψs , 1 H, H_{arom}), 7.31 (Ψd , 1 H, $^3\text{J} = 8.0 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.47 (Ψs , 1 H, H_{arom}), 7.50 (d, 1 H, $^3\text{J} = 8.1 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.55 (d, 1 H, $^3\text{J} = 8.0 \text{ Hz}$, H_{arom}).

^{13}C -NMR (CDCl_3 ; 75 MHz) δ = 29.2, 36.4, 37.0 (2 Signale), 43.6, 112.0, 114.0, 118.2, 120.5, 121.4, 123.4, 136.6, 139.7, 142.3, 145.4 (2 Signale), 148.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 315 (M^+ , 100), 262 (13), 258 ($M^+ - C_4H_9$, 29).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $C_{23}H_{25}N$ 315.1987, gefunden 315.1992.

I.2.6.19 2-Amino-7-trifluormethylfluoren **133**

Nach TAV I.2.2.15 wurden 0.220 g 2-Nitro-7-trifluormethylfluoren **129** (0.789 mmol) mit 0.887 g $SnCl_2 \cdot 2 H_2O$ (3.93 mmol) in 10 ml EtOH und 10 ml EE reduziert (10 Stunden). Aufarbeitung und Reinigung durch Flashchromatographie ($CHCl_3$) ergab 0.186 g 2-Amino-7-trifluormethylfluoren **133** (96%).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 165-167 °C.

1H -NMR ($CDCl_3$; 400 MHz) δ = 3.7-3.9 (s, br, 2 H, NH_2), 3.81 (s, 2 H, CH_2), 6.71 (dd, 1 H, 3J = 8.1 Hz, 4J = 2.2 Hz, H_{arom}), 6.86 (Ψ s, 1 H, H_{arom}), 7.54-7.59 (m, 2 H, H_{arom}), 7.62-7.68 (m, 2 H, H_{arom}).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$; 100 MHz) δ = 36.7, 111.5, 114.2, 118.3, 121.55 (q $^3J(CF)$ = 3.9 Hz), 121.5, 124.03 (q $^3J(CF)$ = 3.9 Hz), 124.9 (q $^1J(CF)$ = 271.6 Hz), 126.8 (q $^2J(CF)$ = 31.9 Hz), 131.4, 142.4, 145.6, 145.9, 146.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 249 (M^+ , 100), 180 ($M^+ - CF_3$, 56), 152 (21).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $C_{14}H_{10}NF_3$ 249.0766, gefunden 249.0769.

I.2.7 Heteroaromatische Verbindungen

I.2.7.1 2-Phenyl-5-nitropyridin **104**

Zu einer Lösung von 1.53 g trockenem Zinkchlorid (11.3 mmol) in 30 ml THF tropfte man unter Argon bei 0 °C 12.0 mmol Phenyllithium (1.8 M in Pentan). In die resultierende Lösung wurden im Argongegenstrom 2.09 g 2-Brom-5-nitropyridin (10.3 mmol) und als Katalysator eine Lösung von $Pd(dba)_2$ (118 mg, 2 mol%) und TFP (191 mg, 8 mol%) in 2 ml THF eingebracht und 18 Stunden bei RT gerührt. Ein Teil des Lösungsmittels wurde abdestilliert, der Rückstand auf Wasser gegossen und die Suspension mit EE extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Reinigung durch Säulenchromatographie (Chloroform/EE 4:1) ergab 0.93 g 2-Phenyl-5-nitropyridin **104** (45 %).

Bei einem anderen Ansatz wurde eine Lösung des 2-Brom-5-nitropyridins in THF bei 0 °C mit einer äquimolaren Menge BF_3 -Etherat versetzt und 30 Min. gerührt. Kupplung erfolgte durch achtzehnstündiges Rühren bei Raumtemperatur nach Zugabe einer eiskalten Mischung

des Zinkaryls und des Katalysators (2.5 mol% Pd(dba)₂ / 10 mol% TFP). Die Aufarbeitung ergab 2-Phenyl-5-nitropyridin **104** in 68 % Ausbeute.

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 120 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 9.47 (d, ³J = 2.6 Hz, 1 H, H_{py}), 8.50 (dd, ³J = 8.8 Hz, ³J = 2.6 Hz, 1 H, H_{py}), 8.03-8.10 (m, 2 H, H_{arom}), 7.89 (d, ³J = 8.8 Hz, 1 H, H_{py}), 7.48-7.54 (m, 3 H, H_{arom}). Die ¹H-NMR Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.²⁶⁷

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 162.5, 145.2, 143.3, 137.0, 131.9, 130.8, 129.1, 127.7, 120.0.

MS (70 eV): m/z (%) = 200 (M⁺, 100), 154 (M⁺ - NO₂, 49), 127 (71).

CHN-Analyse: Theorie C 65.99 %, H 4.03 %, N 13.99 %, gefunden C 65.88 %, H 4.02 %, N 14.07 %.

I.2.7.2 2-(4-*tert*-Butylphenyl)-5-nitropyridin **105**

Nach TAV I.2.3.13 wurden 1.59 g 4-Brom-*tert*-butylbenzol (7.5 mmol) in 20 ml Diethylether bei -78 °C durch Zugabe von 15.0 mmol *t*BuLi (1.5 M in Pentan) in die Lithium-Spezies überführt (schwache Gelbfärbung) und mit trockenem ZnCl₂ (1.02 g, 7.5 mmol) in insgesamt 20 ml THF transmetalliert. Die Kupplung mit 1.38 g 2-Brom-5-nitropyridin (6.8 mmol), Pd(dba)₂ (59 mg) und TFP (95 mg) (16 h bei RT) ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE, 7:1) 1.06 g 2-(4-*tert*-Butylphenyl)-5-nitropyridin **105** (61 %).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 138-140 °C.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 9.46 (d, ³J = 2.6 Hz, 1 H, H_{py}), 8.48 (dd, ³J = 8.8 Hz, ³J = 2.6 Hz, 1 H, H_{py}), 8.01 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.86 (d, ³J = 8.8 Hz, 1 H, H_{py}), 7.53 (d, ³J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 1.35 (s, 9 H, *t*Bu).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 162.4, 154.5, 145.3, 142.5, 134.3, 131.8, 127.5, 126.1, 119.6, 34.9, 31.2.

MS (70 eV): m/z (%) = 256 (M⁺, 15), 241 (M⁺ - CH₃).

CHN-Analyse: Theorie C 70.29 %, H 6.29 %, N 10.93 %, gefunden C 70.14 %, H 6.31 %, N 11.02 %.

I.2.7.3 2-(4-Methoxyphenyl)-5-nitropyridin **143**

Nach TAV I.2.3.13 wurden 1.39 g 4-Bromanisol (7.5 mmol) in 20 ml Diethylether bei -78 °C durch Zugabe von 15.0 mmol *t*BuLi (1.5 M in Pentan) in die Lithium-Spezies überführt

(schwache Gelbfärbung) und mit trockenem ZnCl_2 (1.02 g, 7.5 mmol) in insgesamt 20 ml THF transmetalliert. Die Kupplung mit 1.38 g 2-Brom-5-nitropyridin (6.8 mmol), $\text{Pd}(\text{dba})_2$ (59 mg) und TFP (95 mg) (16 h bei RT) ergab nach Aufarbeitung und Reinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE, 3:1) 1.02 g 2-(4-Methoxyphenyl)-5-nitropyridin **143** (65 %).

Analytik: gelbe Kristalle.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 9.42 (d, ^3J = 2.6 Hz, 1 H, H_{py}), 8.45 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^3J = 2.6 Hz, 1 H, H_{py}), 8.05 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.80 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1 H, H_{py}), 7.01 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 3.87 (s, 3 H, -OMe).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 162.1, 162.0, 145.2, 142.3, 131.8, 129.6, 129.3, 118.9, 114.5, 55.5.

MS (70 eV): m/z (%) = 230 (M^+ , 100), 184 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2$, 30), 157 (64), 141 (15).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ 230.0691, gefunden 230.0692.

I.2.7.4 2-(BOC-Amino)-5-brompyridin **271** (TAV: BOC-Schützung)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Kelly.²⁶⁸

Zu einer Lösung von 5.00 g 5-Brom-2-aminopyridin (28.9 mmol) in 35 ml THF wurden 63.6 ml NaHMDS in Toluol (63.6 mmol, 1 M) gegeben, 15 Min. gerührt und 5.73 g Di-*tert*-butyldicarbonat (BOC-anhydrid, 26.3 mmol) in 10 ml THF zugesetzt. Nach 3 h wurde die dunkelbraune Reaktionsmischung mit 500 ml 0.1 N HCl versetzt und mit EE extrahiert. Die organische Phase wurde entsäuert (Schütteln mit NaHCO_3), über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Reinigung (250 g Kieselgel, EE/PE 1:4) des Rohprodukts ergab 5.08 g 2-(BOC-Amino)-5-Brompyridin **271** (71 %).

Analytik: gelbliche Kristalle, Fp. 95 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 9.57 (s, br, 1 H, NH), 8.40 (d, 1 H, ^4J = 2.5 Hz, H_{py}), 7.95 (d, 1 H, ^3J = 8.9 Hz, H_{py}), 7.73 (dd, 1 H, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 2.5 Hz, H_{py}), 1.55 (s, 9 H, -*t*Bu).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 152.6, 151.5, 148.5, 140.7, 113.9, 112.7, 81.4, 28.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 272 (M^+ , 6), 216 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_9$, 17), 172 ($\text{M}^+ - \text{BOC}$, 47), 57 (100).

I.2.7.5 2-(BOC-Amino)-5-phenylpyridin **272**

Nach TAV I.2.2.1 wurden 1.09 g 2-(BOC-Amino)-5-brompyridin **271** (4.00 mmol), 0.537 g Phenylboronsäure (4.40 mmol) in Gegenwart von 1.89 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (6.00 mmol) und

0.80 g $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in 30 ml DME und 8 ml Wasser gekuppelt (48 Stunden). Aufarbeitung und Flashchromatographie (DCM) ergab 0.767 g 2-(BOC-Amino)-5-phenylpyridin (71 %).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 172 - 174 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.77 (s, br, 1 H, NH), 8.53 (d, 1 H, 4J = 2.5, H_{py}), 7.99 (d, 1 H, 3J = 8.7, H_{py}), 7.81 (dd, 1 H, 3J = 8.7, 4J = 2.4, H_{py}), 7.54 - 7.31 (m, 5 H, H_{arom}), 1.53 (s, 9 H, -*t*Bu).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 152.7, 151.5, 145.9, 137.7, 136.8, 131.5, 129.0, 127.5, 126.7, 112.2, 81.0, 28.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 270 (M^+ , 10), 170 (M^+ - BOC, 100).

I.2.7.6 2-(BOC-Amino)-5-(4-*tert*-butylphenyl)pyridin **273**

Nach TAV I.2.2.1 wurden 1.37 g 2-(BOC-Amino)-5-brompyridin **271** (5.00 mmol), 0.979 g 4-*tert*-Butylphenylboronsäure (5.50 mmol) in Gegenwart von 2.36 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (7.50 mmol) und 0.100 g $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in 30 ml DME und 5 ml Wasser gekuppelt (12 Stunden). Aufarbeitung und Flashchromatographie (DCM) ergab 1.11 g 2-(BOC-Amino)-5-(4-*tert*-butylphenyl)pyridin **273** (68 %).

Analytik: gelbliche Kristalle, Fp. 203- 205 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.78 (s, br, 1 H, NH), 8.54 (d, 1 H, 4J = 2.5, H_{py}), 8.03 (d, 1 H, 3J = 8.6, H_{py}), 7.87 (dd, 1 H, 3J = 8.7, 4J = 2.5, H_{py}), 7.51 - 7.45 (m, 4 H, H_{arom}), 1.54 (s, 9 H, -*t*Bu), 1.35 (s, 9 H, -*t*Bu).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 152.7, 151.3, 150.6, 145.7, 136.6, 134.7, 131.4, 126.3, 125.9, 112.3, 81.0, 34.6, 31.3, 28.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 326 (M^+ , 24), 226 (M^+ - BOC, 100), 211 (M^+ - BOC - CH_3 , 88).

I.2.7.7 2-(BOC-Amino)-5-(4-methoxyphenyl)pyridin **274**

Nach TAV I.2.2.1 wurden 0.600 g 2-(BOC-Amino)-5-brompyridin **271** (2.20 mmol), 0.367 g 4-Methoxyphenylboronsäure (2.40 mmol) in Gegenwart von 1.04 g $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (3.30 mmol) und 0.45 g $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ in 16 ml DME und 4.5 ml Wasser gekuppelt (24 Stunden). Aufarbeitung und Flashchromatographie (DCM) ergab 0.390 g 2-(BOC-Amino)-5-(4-methoxyphenyl)pyridin **274** (59 %).

Analytik: schwach gelber Feststoff, Fp. 178 - 180 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 9.52 (s, br, 1 H, NH), 8.54 (d, 1 H, 4J = 2.5, H_{py}), 8.05 (d, 1 H, 3J = 8.7, H_{py}), 7.82 (dd, 1 H, 3J = 8.7, 4J = 2.4, H_{py}), 7.46 (d, 2 H, 3J = 8.7, H_{arom}), 6.96 (d, 2 H, 3J = 8.7, H_{py}), 3.83 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.53 (s, 9 H, $-t\text{Bu}$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 159.3, 152.9, 151.3, 145.4, 136.4, 131.1, 130.2, 127.7, 114.4, 112.4, 80.8, 55.3, 28.4.

MS (70 eV): m/z (%) = 300 (M^+ , 33), 200 ($\text{M}^+ - \text{BOC}$, 100), 185 ($\text{M}^+ - \text{BOC} - \text{CH}_3$).

I.2.7.8 2-Amino-5-phenylpyridin **117** (TAV: Abspaltung der BOC-Gruppe)

0.600 g 2-(BOC-Amino)-5-phenylpyridin **272** (2.22 mmol) wurden in 10 ml DCM mit 6 ml Trifluoressigsäure und 0.6 ml Wasser unter Argon bei 40 °C solange gerührt, bis das Edukt vollständig umgesetzt war (DC-Kontrolle). Das DCM und ein Teil der Trifluoressigsäure wurden am Rotationsverdampfer entfernt (Vorsicht: Trifluoressigsäure raucht sehr stark), der Rückstand auf Eis gegossen, mit verdünnter Natronlauge alkalisch gemacht und mit einem Gemisch aus Ether und EE extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Reinigung des Rohprodukts durch Säulenchromatographie (EE/PE 1:1) ergab 0.272 g 2-Amino-5-phenylpyridin **117** (72 %).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 112 - 114 °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.31 (d, 4J = 2.6 Hz, 1 H, H_{py}), 7.66 (dd, 3J = 8.5 Hz, 4J = 2.6 Hz, 1 H, H_{py}), 7.52 - 7.26 (m, 5 H, H_{arom}), 6.56 (d, 3J = 8.5 Hz, 1 H, H_{py}), 4.52 (s, 2 H, $-\text{NH}_2$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 157.6, 146.4, 138.3, 136.5, 128.9, 127.4, 126.9, 126.2, 108.5.

MS (70 eV): m/z (%) = 170 (M^+ , 100), 143 ($\text{M}^+ - \text{HCN}$, 20), 115 (28).

I.2.7.9 2-Amino-5-(4-*tert*-butylphenyl)pyridin **118**

Nach TAV I.2.7.8 wurden 0.900 g 2-(BOC-Amino)-5-(4-*tert*-butylphenyl)pyridin **273** (2.76 mmol) in 10 ml DCM mit 9 ml Trifluoressigsäure und 0.9 ml Wasser entschützt. Aufarbeitung und Reinigung des Rohprodukts durch Säulenchromatographie (EE/PE 1:1) ergab 0.430 g 2-Amino-5-(4-*tert*-butylphenyl)pyridin **118** (69 %).

Analytik: farblose Kristalle, Fp. > 159 °C (subl.).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.31 (d, 4J = 2.6 Hz, 1 H, H_{py}), 7.65 (dd, 3J = 8.5 Hz, 4J = 2.6 Hz, 1 H, H_{py}), 7.43 (Ψs, 4 H, H_{arom}), 6.55 (d, 3J = 8.5 Hz, 1 H, H_{py}), 4.51 (s, 2 H, $-\text{NH}_2$), 1.34 (s, 9 H, $-t\text{Bu}$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 157.4, 149.9, 146.2, 136.4, 135.4, 127.2, 125.9, 125.8, 108.5, 34.5, 31.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 226 (M^+ , 70), 211 ($M^+ - CH_3$, 100).

I.2.7.10 2-Amino-5-(4-methoxyphenyl)pyridin **275**

Nach TAV I.2.7.8 wurden 0.290 g 2-(BOC-Amino)-5-(4-methoxyphenyl)pyridin **274** (0.966 mmol) in 5 ml DCM mit 3 ml Trifluoressigsäure und 0.3 ml Wasser entschützt. Aufarbeitung und Reinigung des Rohprodukts durch Säulenchromatographie (EE/PE 1:1) ergab 0.145 g 2-Amino-5-(4-methoxyphenyl)pyridin **275** (75 %).

Analytik: schwach beiger Feststoff, Fp. 174 - 175 °C.

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 8.25 (d, 4J = 2.5 Hz, 1 H, H_{py}), 7.60 (dd, 3J = 8.5 Hz, 4J = 2.5 Hz, 1 H, H_{py}), 7.40 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.94 (d, 3J = 8.9 Hz, 2 H, H_{arom}), 6.54 (d, 3J = 8.5 Hz, 1 H, H_{py}), 4.46 (s, br, 2 H, $-NH_2$), 3.82 (s, 3 H, $-OCH_3$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 158.9, 157.2, 146.0, 136.2, 130.9, 127.3, 127.2, 114.4, 108.4, 55.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 200 (M^+ , 100), 185 ($M^+ - CH_3$, 95).

I.2.7.11 5-Brom-2-nitropyridin **268**

Die Darstellung erfolgte nach einer Methode von Hertog.²⁶⁹

Unter Kühlung und Temperaturkontrolle (10 - 20 °C) wurden 3.00 g 2-Amino-5-brompyridin (17.3 mmol) in 10 ml Schwefelsäure (98 %) gelöst. Währenddessen wurde unter Kühlung (Eis/Kochsalz) eine Mischung aus 25 ml Wasserstoffperoxid (30 %) und 50 ml Oleum (30 %) hergestelltⁱ und diese der obigen Lösung langsam zugetropft, wobei die Temperatur zwischen 10 und 20 °C gehalten wurde. Die Reaktionsmischung wurde bis zum Abklingen der exothermen Reaktion weiter gekühlt (1 - 3 Stunden), bei RT über Nacht nachgerührt und auf Eiswasser gegossen (300 ml). Der Niederschlag wurde abgesaugt, gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 1.94 g (55 %). Eine Probe wurde Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Analytik: farblose Kristalle, Fp. 148 - 149 °C.

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 8.67 (t, 4J = 1.8 Hz, 1 H, H_{py}), 8.15 (Ψd, 2 H, H_{py}).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 150.1, 142.4, 127.0, 119.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 204/202 (M^+ , 12/11), 158/156 ($M^+ - NO_2$), 76 ($M^+ - NO_2 - Br$, 82).

ⁱ Zur Herstellung sollten die Edukte gut vorgekühlt werden. Die entstehende Carosche Säure zersetzt sich bei höheren Temperaturen.

I.2.7.12 2-Nitro-5-phenylpyridin 106

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Bumagin.²⁷⁰

Unter Argon wurde eine Mischung von 1.015 g 5-Brom-2-nitropyridin **268** (5.00 mmol), 0.732 mg (6.00 mmol, 1.2 Äquiv.) Phenylboronsäure, 2.860 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (10.0 mmol) und 0.112 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (10 mol %) in 10 ml DMF und 2 ml Wasser 3 Stunden auf 130 °C erhitzt. Die abgekühlte Reaktionsmischung wurde auf 200 ml Eiswasser gegossen, der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, in EE (150 ml) gelöst, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Reinigung des Rohprodukts (~ 1 g) durch Säulenchromatographie (DCM) ergab 0.802 g 2-Nitro-5-phenylpyridin **106** (81 %).

Analytik: schwach gelbe Kristalle.

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 8.82 (dd, 4J = 2.3 Hz, 5J = 0.5 Hz, 1 H, H_{py}), 8.32 (dd, 3J = 8.4 Hz, 5J = 0.6 Hz, 1 H, H_{py}), 8.17 (dd, 3J = 8.4 Hz, 5J = 2.3 Hz, 1 H, H_{py}), 7.7-7.4 (m, 5 H, H_{arom}).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 148.6, 140.1, 135.4, 130.7, 128.3, 122.7, 122.5, 120.5, 111.1.

MS (70 eV): m/z (%) = 200 (M^+ , 44), 154 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2$, 100), 127 (34).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$ 200.0586, gefunden 200.0588.

I.2.7.13 2-Nitro-5-(4-tert-butylphenyl)pyridin 107

Unter Argon wurde eine Mischung von 1.015 g 5-Brom-2-nitropyridin **268** (5.00 mmol), 1.068 g (6.00 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-tert-Butylphenylboronsäure, 2.860 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (10.0 mmol) und 0.110 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (10 mol %) in 11 ml DMF und 1.5 ml Wasser drei Stunden auf 130 °C erhitzt. Die abgekühlte Reaktionsmischung wurde auf 200 ml Eiswasser gegossen, der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, in EE (170 ml) gelöst, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Reinigung des Rohprodukts durch Säulenchromatographie (DCM) ergab 0.897 g 2-Nitro-5-(4-tert-butylphenyl)pyridin **107** (70 %).

Analytik: farblose Kristalle.

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ = 8.82 (d, 4J = 2.1 Hz, 1 H, H_{py}), 8.31 (d, 3J = 8.2 Hz, 1 H, H_{py}), 8.18 (dd, 3J = 8.2 Hz, 5J = 2.1 Hz, 1 H, H_{py}), 7.56 (Ψ s, 4 H, H_{arom}), 1.36 (s, 9 H, *t*Bu).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 153.2, 147.0, 142.3, 137.3, 132.4, 127.2, 126.5, 118.2, 34.8, 31.2.

MS (70 eV): m/z (%) = 256 (M^+ , 18), 241 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 100), 195 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{NO}_2$, 100).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ 265.1213, gefunden 265.1207.

I.2.8 4-Nitrostilbene

I.2.8.1 4-Nitrobenzylphosphonsäurediethylester **278**

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Deussen.²⁷¹

In einem Schliffkolben mit Claisenbrücke und eisgekühlter Vorlage wurde eine Mischung aus 17.3 g 4-Nitrobenzylbromid (0.08 mol) und 26.6 g Triethylphosphit (0.23 mol) während drei Stunden auf 150 °C erwärmt (Badtemperatur) und bei dieser Temperatur für 24 h gehalten. Das dabei frei werdende Ethylbromid sammelte sich in der Vorlage. Durch fraktionierte Destillation (Marburger Modell) des zurückbleibenden dunklen Öls im HV (0.4 mbar) erhielt man nach einem Vorlauf von Triethylphosphit bei 150 - 155 °C das Produkt. Die Ausbeute von **278** betrug 80 % (17.5 g).

Analytik: braunrotes, viskoses Öl.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 8.13 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.43 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J_{P-H} = 2.5 Hz, 2 H, H_{arom}), 4.06 - 3.92 (m, 4 H, -CH₂-), 3.25 (d, ³J = 17.3 Hz, 2 H, -CH₂-Ar), 1.27 (t, ³J = 6.8 Hz, 6 H, -CH₃). Die ¹H-NMR-Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.²⁷¹

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 146.8 (d, J_{C-P} = 4 Hz), 139.6 (d, J_{C-P} = 9 Hz), 130.5 (d, J_{C-P} = 6.5 Hz), 123.5 (d, J_{C-P} = 3 Hz), 62.3 (d, J_{C-P} = 7 Hz), 33.9 (d, J_{C-P} = 137 Hz), 16.2 (d, J_{C-P} = 6 Hz).

MS (70 eV): m/z (%) = 273 (M⁺, 25), 227 (M⁺ - NO₂, 11), 137 (M⁺ - 4-Nitrobenzyl, 36) 136 (M⁺ - PO(OEt)₂, 25), 109 (M⁺, 100).

I.2.8.2 *trans*-4-Nitrostilben **5** (TAV: Wittig-Reaktion)

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Hanna.²⁷²

Zu einer Lösung von 0.048 mol Natriumethylat in 50 ml trockenem Ethanol wurden 5.46 g 4-Nitrobenzylphosphonsäurediethylester (0.020 mol) gegeben. Unter Rühren tropfte man in ca. 30 Min zu dieser Mischung 2.12 g frisch destillierten Benzaldehyd (0.02 mol), gelöst in 50 ml Ethanol. Nach weiteren 30 Min bei Raumtemperatur wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt, wobei das Produkt in gelben Kristallen ausfiel. Nach 1 Stunde wurde das 4-Nitrostilben abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Ausbeute: 3.87 g *trans*-4-Nitrostilben **5** (86 %).

Analytik: gelbe Nadeln.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 8.20 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.63 - 7.09 (m, 8 H).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 146.8, 143.9, 136.2, 133.3, 128.9, 127.0, 126.8, 126.3, 124.1.

MS (70 eV): m/z (%) = 225 (M^+ , 72), 178 ($\text{M}^+ - \text{H} - \text{NO}_2$, 100).

I.2.8.3 *trans*-4'-Methyl-4-nitrostilben **134**

Nach TAV I.2.8.2 wurden 7.66 g 4-Nitrobenzylphosphonsäurediethylester **278** (0.028 mol), 0.067 mol Natriumethylat und 3.36 g 4-Methylbenzaldehyd (0.028 mol) in insgesamt 130 ml Ethanol zu 5.89 g *trans*-4'-Methyl-4-nitrostilben **134** (88 %) umgesetzt. Es wurde noch zweimal aus Ethanol umkristallisiert.

Analytik: gelbe Nadeln. Fp. 150 °C.

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.20 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.60 (d, 3J = 8.7 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.43 (d, 3J = 8.1 Hz, 2 H), 7.17 (m, 4 H, H_{arom} , CH=CH), 2.38 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 146.6, 144.1, 139.0, 133.4, 129.6, 126.9, 126.6, 125.2, 124.1, 21.2; MS (70 eV): m/z (%) = 239 (M^+ , 100), 178 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{NO}_2$, 52).

I.2.8.4 *trans*-4'-Ethyl-4-nitrostilben **135**

Nach TAV I.2.8.2 wurden 7.06 g 4-Nitrobenzylphosphonsäurediethylester **278** (0.026 mol), 0.062 mol Natriumethylat und 3.55 g 4-Ethylbenzaldehyd (0.026 mol) in insgesamt 120 ml Ethanol zu 5.92 g *trans*-4'-Ethyl-4-nitrostilben **135** (90 %) umgesetzt. Trotz mehrfacher Umkristallisation aus Ethanol (3 mal) bzw. EE/PE (1:10) enthielt das Produkt 5 % (aus NMR) des *cis*-Isomers. *Cis*- und *trans*-Isomer konnten auch säulenchromatographisch nicht getrennt werden.

Analytik: tiefgelbe Nadeln (*cis/trans*-Gemisch).

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8.20 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.60 (d, 3J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.48 (d, 3J = 8.1 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.25 (d, 3J = 16.2 Hz, 1 H, CH=), 7.25 (d, 3J = 8.1 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.09 (d, 3J = 16.3 Hz, 1 H, CH=), 2.70 (q, 3J = 7.7 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 1.29 (t, 3J = 7.7 Hz, 3 H, $-\text{CH}_3$).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 146.5, 145.3, 144.0, 133.6, 133.2, 128.3, 127.2, 126.6, 125.3, 124.0, 28.6, 15.3.

MS (70 eV): m/z (%) = 253 (M^+ , 100), 238 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 47), 192 ($\text{M}^+ - \text{NO}_2$, 16), 191 (21), 178 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{NO}_2$, 42).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ 253.1103, gefunden 253.1102.

I.2.8.5 *trans*-4'-*iso*-Propyl-4-nitrostilben 136

Nach TAV I.2.8.2 wurden 5.73 g 4-Nitrobenzylphosphonsäurediethylester **278** (0.021 mol), 0.050 mol Natriumethylat und 3.11 g 4-*iso*-Propylbenzaldehyd (0.021 mol) in insgesamt 110 ml Ethanol zu 4.21 g *trans*-4'-*iso*-Propyl-4-nitrostilben **136** (75 %) umgesetzt. Trotz mehrfacher Umkristallisation aus Ethanol (2 mal) bzw. EE/PE (1:10) enthielt das Produkt 4 % (aus NMR) des *cis*-Isomers. *Cis*- und *trans*-Isomer konnten auch säulenchromatographisch nicht getrennt werden.

Analytik: tiefgelbe Nadeln, (*cis/trans*-Gemisch).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 8.20 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.61 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.47 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.25 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.24 (d, ³J = 16.3 Hz, 1 H, CH=), 7.09 (d, ³J = 16.3 Hz, 1 H), 2.93 (p, ³J = 7.0 Hz, 1 H, -CH-), 1.27 (d, ³J = 7.0 Hz, 6 H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ = 150.0, 146.6, 144.1, 133.8, 133.3, 127.1, 127.0, 126.7, 125.3, 124.1, 34.0, 23.8.

MS (70 eV): m/z (%) = 267 (M⁺, 100), 252 (M⁺ - CH₃, 75), 235 (14), 178 (M⁺ - C₃H₇ - NO₂, 7).

CHN-Analyse: Theorie C 76.38 %, H 6.41 %, N 5.24 %, gefunden C 76.51 %, H 6.32 %, N 5.31 %

I.2.8.6 *trans*-4'-*sec*-Butyl-4-nitrostilben 138

Diese Substanz wurde von B. Ludolph zur Verfügung gestellt.²⁷³

Analytik: gelbe Nadeln.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 8.20 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.61 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.48 (d, ³J = 8.2 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.28 - 7.15 (m, 4 H, H_{arom}, CH=CH), 2.63 (m, 1 H, -CH), 1.62 (m, 2 H, -CH₂), 1.25 (d, ³J = 7.0 Hz, 3 H, CH-CH₃), 0.84 (t, ³J = 7.3 Hz, 3 H, -CH₂-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ = 148.8, 146.6, 144.1, 133.8, 127.6, 127.0, 126.7, 125.3, 124.1, 41.5, 31.0, 21.6, 12.2.

MS (70 eV): m/z (%) = 281 (M⁺, 45), 252 (M⁺ - C₂H₅, 100).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₈H₁₉NO₂ 281.1419, gefunden 281.1417.

I.2.8.7 *trans*-4'-*tert*-Butyl-4-nitrostilben 137

Nach TAV I.2.8.2 wurden 6.83 g 4-Nitrobenzylphosphonsäurediethylester **278** (0.025 mol), 0.060 mol Natriumethylat und 4.06 g 4-*tert*-Butylbenzaldehyd (0.025 mol) in insgesamt 120 ml Ethanol zu 4.99 g *trans*-4'-*tert*-Butyl-4-nitrostilben (71 %) umgesetzt. Trotz mehrfa-

cher Umkristallisation aus Ethanol bzw. EE/PE (1:10) enthielt das Produkt ~ 5 % (aus NMR) des *cis*-Isomers.

Reines *trans*-4'-*tert*-Butyl-4-nitrostilben wurde durch Isomerisierung mit Iod erhalten. Dazu wurden 2.50 g **137** (8.9 mmol) in 150 ml EE gelöst, mit 0.50 g (2.0 mmol) Iod versetzt und die Lösung 17 h unter Rückfluß gekocht. Das Lösungsmittel wurde eingeeengt, das Produkt abgesaugt, mit Methanol gewaschen und aus Ethanol/EE umkristallisiert.

Analytik: tiefgelbe Nadeln, (*trans*) Fp. 162 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ = 8.18 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.59 (d, ³J = 8.8 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.48 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.41 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.25 (d, ³J = 16.3 Hz, 1 H, CH=), 7.08 (d, ³J = 16.3 Hz, 1 H, CH=), 1.33 (s, 9 H, *t*Bu).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ = 152.2, 146.6, 144.1, 133.4, 133.2, 126.8, 126.7, 125.8, 125.5, 124.1, 34.7, 31.2.

MS (70 eV): m/z (%) = 281 (M⁺, 42), 266 (M⁺ - CH₃, 100), 220 (M⁺ - CH₃ - NO₂, 20), 178 (M⁺ - C₄H₉ - NO₂, 11).

HRMS (70 eV): m/z Berechnet für C₁₈H₁₉NO₂ 281.1419, Gefunden 281.1420.

1.3 Mutagenitätsuntersuchungen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ames-Tests wurden exakt nach dem von Maron und Ames angegebenen Protokoll durchgeführt,⁶³ wobei jedes Experiment durch Positiv- und Negativkontrollen überprüft wurde. Alle Teststämme wurden freundlicherweise von B. Ames zur Verfügung gestellt. Die Konzentration des S9-Mix (Arochlor-induziert, erworben von CCR) in den entsprechenden Proben betrug 10%. Zur Herstellung der jeweiligen Verdünnungsreihen (≥ 5 Konzentrationen) dienten Stammlösungen der Testsubstanzen in DMSO bzw. THF. Einzelheiten hierzu sind im Text angegeben. Alle Proben wurden in mindestens dreifacher Ausführung getestet. Bei sehr aktiven Substanzen wurden die Ergebnisse durch zusätzliche Tests (z.T. zeitlich versetzt) verifiziert. In den entsprechenden Tabellen sind jeweils die Mittelwerte aufgelistet. Die Berechnung des mutagenen Potentials (Revertanten/nmol) erfolgte durch Regressionsanalyse (siehe C.5) über den linearen Bereich der Dosis-Wirkungs-Kurve.

J Literaturverzeichnis

1. H. Marquardt, (1994) Chemische Kanzerogenese, in: H. Marquardt, S.G. Schäfer (Hrsg.) *Lehrbuch der Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 124 - 146.
2. Pschyrembel, Medizinisches Wörterbuch (1986) Walter de Gruyter Verlag, 255. Auflage.
3. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
4. W.C. Hueper, F.H. Wiley, H.D. Wolfe, K.E. Ranta, M.F. Leming, F.R. Blood (1938) Experimental production of bladder tumors in dogs by administration of β -naphthylamine, *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 20, 46 - 84.
5. S. Spitz, W.H. Maguigan, K. Dobriner (1950) The carcinogenic action of benzidine, *Cancer* 3, 789 - 804.
6. A.L. Walpole, M.H.C. Williams, D.C. Roberts (1952) The carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3:2'-dimethyl-4-aminodiphenyl. *Br. J. Ind. Med.* 11, 105 - 109.
7. J.A. Miller, E.C. Miller (1969) The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides, *Prog. Exp. Tumor Res.* 11, 273 - 301.
8. B. Vogelstein, E.R. Fearon, S.E. Kern, S.R. Hamilton, A.C. Preisinger, Y. Nakamura, R. White (1989) Allelotype of colorectal carcinomas, *Science* 244, 207 - 211.
9. B.N. Ames, L.S. Gold, W.C. Willett (1995) The causes and prevention of cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5258 - 5265.
10. B.N. Ames, M. Profet, L.S. Gold (1990) Nature's chemicals and synthetic chemicals: comparative toxicology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7782 - 7786.
11. J.C. Barrett (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment, *Env. Health Persp.* 100, 9-20.
12. D. Hoffmann, E.L. Wynder (1994) Aktives und Passives Rauchen, in: H. Marquardt, S.G. Schäfer (Hrsg.) *Lehrbuch der Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 589 - 605.
13. a) R. Sinha, N. Rothman, C.P. Salmon, M.G. Knize, E.D. Brown, C.A. Swanson, D. Rhodes, S. Rossi, J.S. Felton, O.A. Levander (1998) Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods to varying degrees of doneness and gravy made from meat drippings, *Food Chem. Toxicol.* 36, 279 - 287.
 b) M.G. Knize, R. Sinha, N. Rothman, E.D. Brown, C.P. Salmon, O.A. Levander, P.L. Cunningham, J.S. Felton (1995) Heterocyclic amine content in fast-food meat products, *Food Chem. Toxicol.* 33, 545 - 551.
14. M. Butz (1999) *Beruflich verursachte Krebserkrankungen*, HVBG.
15. D.R. Harter (1985) The Use and Importance of Nitroaromatic Chemicals in the Chemical Industry, in: D.E. Rickert (Ed.), *Toxicity of Nitroaromatic Compounds*, Hemisphere, New York, 1 - 13.
16. a) E.L. Wynder, R. Goldsmith (1977) The epidemiology of bladder cancer. A second look, *Cancer* 40, 1246 - 1268.

- b) D.T. Wigle, Y. Mao, M. Grace (1980) Relative importance of smoking as a risk factor for selected cancers, *Can. J. Public Health* 71, 269 - 275.
- c) S. Mommsen, J. Aagaard (1983) Tobacco as a risk factor in bladder cancer, *Carcinogenesis* 4, 335 - 338.
17. E. Richter (1994) Aromatische Amine, in: H. Marquardt, S.G. Schäfer (Hrsg.) *Lehrbuch der Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 492 - 503.
18. T. Hirayama, M. Nohara, T. Matsuoka, M. Murai, S. Fukui (1983) Mutagenicity of photochemical reaction of biphenyl with various concentrations of nitrogen oxides against *Salmonella typhimurium* TA98, *Eisei Kagaku* 29, 63 - 70.
19. R. Braun, G.F. Fuhrmann, W. Legrum, C. Steffen (1999) *Spezielle Toxikologie für Chemiker*, Teubner Verlag, Stuttgart, 142.
20. H.G. Parkes, A.E.J. Evans (1984) Epidemiology of aromatic amine cancers, in: C.E. Searle (Ed.) *Chemical carcinogens, Vol. 1*, ACS, Washington DC, 277 - 301.
21. A. Haddow, R.J.C. Harris, G.A.R. Kon, E.M.F. Roe (1948) The growth-inhibitory and carcinogenic properties of 4-Aminostilbene and derivatives, *Trans. Roy. Soc. (London)* A 241, 147 - 195.
22. P.N. Harris (1947) Production of Tumors in Rats by 2-Aminofluorene and 2-Acetylaminofluorene, *Cancer Res.* 7, 88 - 94.
23. a) R.L. Dobson (1963) Anthramine carcinogenesis in the skin of rats, I. The epidermis, *J. Nat. Cancer Inst.* 31, 841 - 859.
- b) P. Shubik, G. Pietra, G.D. Porta (1960) Studies of skin carcinogenesis in the Syrian golden hamster, *Cancer Res.* 20, 100 - 105.
24. G. Lamberlin, J. Roba, R. Roncucci, R. Parmentier (1975) Carcinogenicity of 6-amino-chrysene in mice, *Eur. J. Cancer* 11, 327 - 334.
25. H. Dannenberg, C. Huggins (1969) On the carcinogenic activity of aminophenanthrenes and their derivatives, *Z. Krebsforsch.* 72, 321 - 324.
26. K. El-Bayoumy, A. Rivenson, B. Johnson, J. DiBello, P. Little, S.S. Hecht (1988) Comparative tumorigenicity of 1-nitropyrene, 1-nitrosopyrene, and 1-aminopyrene administered by gavage to Sprague - Dawley rats, *Cancer Res.* 48, 4256 - 4260.
27. R.C. Garner, C.N. Martin, D.B. Clayson (1984) Carcinogenic aromatic amines and related compounds, in: C.E. Searle (Ed.) *Chemical carcinogens, Vol. 1*, ACS, Washington DC, 175 - 276.
28. F.A. Beland, F.F. Kadlubar (1990) Metabolic Activation and DNA Adducts of Aromatic Amines and Nitroaromatic Hydrocarbons, in: C.S. Cooper, P.L. Grover (Eds.) *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis, Handbook exp. Pharmacol. I, Vol. 8*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 267 - 325.
29. F.T. Hatch, M.G. Knize, D.H. Moore, J.S. Felton (1992) Quantitative correlation of mutagenic and carcinogenic potencies for heterocyclic amines from cooked foods and additional aromatic amines, *Mut. Res.* 271, 269 - 287.
30. H. Tokiwa, Y. Ohnishi (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 17, 23 - 60.

-
31. a) S.B. Neal, G.S. Probst (1983) Chemically-induced sister-chromatid exchange in vivo in bone marrow of Chinese hamsters, an evaluation of 24 compounds, *Mut. Res.* 113, 33 - 43.
- b) D.J. Tucker, T. Ong (1984) Induction of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes by 2,4,7-trinitro-9-fluorenone, *Mut. Res.* 138, 181 - 184.
32. B.E. Butterworth, L.L. Earle, S. Strom, R. Jirtle, G. Michapolus (1983) Induction of DNA repair in human and rat hepatocytes by 1,6-dinitropyrene, *Mut. Res.* 122, 73 - 80.
33. H. Uhleke, K. Nestel (1967) Hydroxylamino- und Nitrosobiphenyl: Biologische Oxidationsprodukte von 4-Aminobiphenyl und Zwischenprodukte der Reduktion von 4-Nitrobiphenyl, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. Exp. Path.* 257, 151 - 171.
34. F. Oesch (1994) Fremdstoffmetabolismus, in: H. Marquardt, S.G. Schäfer (Hrsg.) *Lehrbuch der Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 68 - 93.
35. E.C. McCoy, H.S. Rosenkranz, R. Mermelstein (1981) Evidence for the existence of a family of bacterial nitroreductases capable of activating nitrated polycyclics to mutagens, *Environ. Mutagen.* 3, 421 - 427.
36. D.E. Rickert (1987) Metabolism of Nitroaromatic Compounds, *Drug Metabol. Rev.* 18, 23 - 53.
37. S. Ning, X. Xiaobai (1997) Reductive metabolism of 4-nitrobiphenyl by rat liver fraction, *Carcinogenesis* 18, 1233 - 1240.
38. a) L. Möller, S. Tornquist, B. Beije, J. Rafter, R. Toftgard, J.-A. Gustafsson (1987) Metabolism of the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene in the isolated perfused rat lung and liver, *Carcinogenesis* 8, 1847 - 1852.
- b) S. Tornquist, L. Möller, J. Gabrielsson, J.A. Gustafsson, R. Toftgard (1990) 2-Nitrofluorene metabolism in the rat lung. Pharmacokinetic and metabolic effects of beta-naphthoflavone treatment, *Carcinogenesis* 11, 1249 - 1254.
- c) L. Möller, M. Corrie, T. Midtvedt, J. Rafter, J.-A. Gustafsson (1988) The role of the intestinal microflora in the formation of mutagenic metabolites from the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene, *Carcinogenesis* 9, 823 - 830.
- d) B. Beije, L. Möller, (1988) Correlation between induction of unscheduled DNA synthesis in the liver and excretion of mutagenic metabolites in the urine of rats exposed to the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene, *Carcinogenesis* 9, 1465 - 1470.
39. a) B. Zielinska, W.P. Harger, J. Arey, R.W. Lee (1988) Mutagenic activities of selected nitrofluoranthene derivatives in *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA98NR and TA98/1,8-DNP6, *Mut. Res.* 206, 131 - 140.
- b) B. Zielinska, W.P. Harger, J. Arey, A.M. Winer, R.A. Haas, C.V. Hanson (1987) The mutagenicity of 2-Nitrofluoranthene and its in vitro hepatic metabolites, *Mut. Res.* 190, 259 - 266.
40. a) K. El-Bayoumy, S.S. Hecht (1984) Identification of *trans*-1,2-dihydro-1,2-dihydroxy-6-nitrochrysene as the major mutagenic metabolite of 6-nitrochrysene, *Cancer Res.* 44, 3408 - 3413.

- b) F.A. Beland, R.H. Heflich, P.C. Howard, P.P. FU (1985) The in vitro metabolic activation of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons, in: R.G. Harvey (Ed.) *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*, ACS, Washington DC, 371 - 396.
- c) Z. Djuric, E.K. Fifer, P.C. Howard, F.A. Beland (1986) Oxidative microsomal metabolism of 1-nitropyrene and DNA binding of oxidized metabolites following nitroreduction, *Carcinogenesis* 7, 1073 - 1079.
41. Y. Yamazoe, D.W. Miller, C.C. Weis, K.L. Dooley, T.V. Zenser, F.A. Beland, F.F. Kadlubar (1985) DNA adducts formed by ring-oxidation of the carcinogen 2-naphthylamine with prostaglandin H synthase in vitro and in the dog urothelium in vivo, *Carcinogenesis* 6, 1379 - 1387.
42. R.H. Heflich, P.C. Howard, F.A. Beland (1983) 1-Nitrosopyrene: an intermediate in the metabolic activation of 1-nitropyrene to a mutagen in *Salmonella typhimurium* TA1538, *Mut. Res.* 149, 25 - 32.
43. a) C.M. King (1974) Mechanism of reaction, tissue distribution, and inhibition of aryl hydroxamic acid acyltransferase, *Cancer Res.* 34, 1503 - 1515.
- b) C.M. King, N.R. Traub, Z.M. Lortz, M.R. Thissen (1979) Metabolic activation of aryl hydroxamic acids by N,O-acyltransferase of rat mammary gland, *Cancer Res.* 39, 3369 - 3372.
- c) C.M. King, I.B. Glowinski (1983) Acetylation, deacetylation and acyltransfer, *Environ. Health Persp.* 49, 43 - 50.
44. a) T.J. Flammang, F.F. Kadlubar (1986) Acetyl coenzyme A-dependent metabolic activation of N-hydroxy-3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and several carcinogenic N-hydroxy arylamines in relation to tissue and species differences, other acyl donors, and arylhydroxamic acid-dependent acyltransferases, *Carcinogenesis* 7, 919 - 926.
- b) T.J. Flammang, J.G. Westra, F.F. Kadlubar, F.A. Beland (1985) DNA adducts formed from the probable proximate carcinogen, N-hydroxy-3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, by acid catalysis or S-acetyl coenzyme A-dependent enzymatic esterification, *Carcinogenesis* 6, 251 - 258.
45. M. Famulok, G. Boche (1989) Formation of N-(Deoxyguanosin-8-yl)aniline in the in vitro Reaktion of N-Acetoxyaniline with Deoxyguanosine and DNA, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28, 468 - 469.
46. M. Famulok, F. Bosold, G. Boche (1989) Synthesis of N-Acetoxy-2-aminonaphthalene, an Ultimate Carcinogen of the Carcinogenic 2-Naphthylamine, and Its In Vitro Reaction with (Bio)Nucleophiles, *Tetrahedron Lett.* 30, 321 - 324.
47. M. Famulok, F. Bosold, G. Boche (1989) Synthese von O-Acetyl-N-(4-biphenyl)-hydroxylamin ("N-Acetoxy-4-aminobiphenyl"), einem entscheidenden Metaboliten des carcinogenen 4-Aminobiphenyls, und seine Reaktion mit Deoxyguanosin, *Angew. Chem.* 101, 349 - 350.
48. F. Bosold, G. Boche (1990) The Ultimate Carcinogen, O-Acetyl-N-(2-fluorenyl)-hydroxylamin ("N-Acetoxy-2-aminofluorene"), and Its Reaction in vitro to Form 2-[N-(Deoxyguanosin-8-yl)amino]fluorene, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29, 63 - 64.
49. C. Meier, G. Boche (1990) N-Aryl-O-(α -aminoacyl)hydroxylamine: Modellreaktionen zur Aktivierung von monocyclischen aromatischen Aminen zu ultimativen Carcinogenen durch α -Aminosäuren, *Chem. Ber.* 123, 1691 - 1698.

50. W.G. Humphreys, F.F. Kadlubar, F.G. Guengerich (1992) Mechanism of C8 alkylation of guanine residues by activated arylamines: Evidence for initial adduct formation at the N7 position, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8278 - 8282.
51. F.A. Beland, F.F. Kadlubar (1985) Formation and persistence of arylamine DNA-adducts in vivo, *Environ. Health Perspect.* 62, 19 - 30.
52. R.C. Gupta, N.R. Dighe (1984) Formation and Removal of DNA adducts in rat liver treated with N-hydroxy derivatives of 2-acetylaminofluorene, 4-acetylaminobiphenyl, and 2-acetylaminophenanthrene. *Carcinogenesis* 5, 343 - 349.
53. E. Kriek, (1965) On the interaction of N-2-fluorenylhydroxylamine with nucleic acids in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20, 793 - 799.
54. F.A. Beland, M.C. Poirier (1989) DNA adducts and carcinogenesis, in: A.E. Sirica (Ed.) *The Pathobiology of Neoplasia*, Plenum Publishing Corp., New York, 57 - 80.
55. H.S. Rosenkranz, E.C. McCoy, M. Frierson, G. Klopman (1985) The role of DNA Sequence and Structure of the electrophile on the Mutagenicity of Nitroarenes and Arylamine Derivatives, *Environ. Mutagen* 7, 645 - 653.
56. a) R.W. Wiseman, S.J. Stowers, E.C. Miller, M.W. Anderson, J.A. Miller (1986) Activating mutations of the c-Ha-ras protooncogene in chemically induced hepatomas of the male B6C3F1 mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5825 - 5829.
b) M.G. Manjanatha, E.E. Li, P.P. Fu, R.H. Heflich (1996) H- and K-ras mutational profiles in chemically-induced liver tumors from B6C3F1 mice and CD-1 mice, *J. Toxicol. Environ. Health* 47, 195 - 208.
57. a) M.C. Poirer, N.F. Fullerton, T. Kinouchi, B.A. Smith, F.A. Beland (1991) Comparison between DNA-adduct formation and tumorigenesis in livers and bladders of mice chronically fed 2-acetylaminofluorene, *Carcinogenesis* 12, 895 - 900.
b) M.C. Poirer, N.F. Fullerton, B.A. Smith, F.A. Beland (1995) DNA adduct formation and tumorigenesis in mice during the chronic administration of 4-aminobiphenyl at multiple dose levels, *Carcinogenesis* 16, 2917 - 2921.
58. a) F.A. Beland, D.T. Beranek, K.L. Dooley, R.H. Heflich, F.F. Kadlubar (1983) Arylamine-DNA adducts in vitro and in vivo: their role in bacterial mutagenesis and urinary bladder carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.* 49, 125 - 134.
b) P.C. Howard, R.H. Heflich, F.E. Evans, F.A. Beland (1983) Formation of DNA adducts in vitro and in *Salmonella* typhimurium upon metabolic reduction of the environmental mutagen 1-nitropyrene, *Cancer Res.* 43, 2052 - 2058.
c) R.H. Heflich, E.K. Fifer, Z. Djuric, F.A. Beland (1985) DNA adduct formation and mutation induction by nitropyrenes in *Salmonella* and Chinese hamster ovary cells: relationships with nitroreduction and acetylation, *Environ. Health Perspect.* 62, 135 - 143.
59. B.N. Ames (1972) A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens, in: H.E. Sutton, M.I. Harris (Eds.), *Mutagenic Effects of Environmental Contaminants*, Academic Press, New York 57 - 66.
60. E. Zeiger (1990) Strategies for the Use of Genetic Toxicity Tests, *Drug Metab. Rev.* 22, 765 - 775.
61. C.C. Harris (1991) Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s, *Cancer Res.* 51, 5023-5044.

62. B.N. Ames, L. Haroun (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70, 782 - 786.
63. D.M. Maron, B.N. Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mut. Res.* 113, 173 - 215.
64. J.J. Espinosa-Aguirre, M. Yamada, K. Matsui, M. Watanabe, T. Sofuni, T. Nohmi (1999) New O-acetyltransferase-deficient Ames Salmonella strains generated by specific gene disruption, *Mut. Res.* 439, 159 - 169.
65. H.S. Rosenkranz, R. Mermelstein (1983) Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were created equal, *Mut. Res.* 114, 217 - 267.
66. E.C. McCoy, M. Anders, H.S. Rosenkranz (1983) The basis of the insensitivity of Salmonella typhimurium TA98/1.8-DNP6 to the mutagenic action of nitroarenes, *Mut. Res.* 121, 17 - 23.
67. M. Watanabe, M. Ishidate, T. Nohmi (1989) A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of salmonella typhimurium strains TA98 and TA100, *Mut. Res.* 216, 211 - 220.
68. M. Watanabe, M., Ishidate, T. Nohmi (1990) Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of Salmonella typhimurium tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels, *Mut. Res.* 234, 337 - 348.
69. a) T. Kamataki, A. Suzuki, H. Kushida, H. Iwata, M. Watanabe, T. Nohmi, K. Fujita (1998) Development of genetically engineered Salmonella highly sensitive to heterocyclic Amines, Oral Abstract on the 7th International Conference on Carcinogenic/Mutagenic N-Substituted Aryl Compounds, 4.
b) A. Suzuki, H. Kushida, H. Iwata, M. Watanabe, T. Nohmi, K. Fujita, F.J. Gonzalez, T. Kamataki (1998) Establishment of a Salmonella tester strain highly sensitive to mutagenic heterocyclic amines, *Cancer. Res.* 58, 1833 - 1838.
70. P. Gee, D.M. Maron, B.N. Ames (1994) Detection and classification of mutagens: A set of base-specific Salmonella tester strains, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91, 11606 - 11610.
71. P.D. Josephy, P. Gruz, T. Nohmi (1997) Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays, *Mut. Res.* 386, 1 -23.
72. M.M. Shahin (1994) Structure-activity relationships within various series of p-phenylenediamine derivatives, *Mut. Res.* 307, 83 - 93.
73. H. George (1990) Synthese O-acylierter aromatischer Hydroxylamine und deren Reaktionen mit Nukleophilen und Desoxyribonukleinsäure, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg.
74. B. Kutscher (1991) Akzeptor-substituierte N-Aryl-O-acylhydroxylamine: Modellreaktionen zur Carcinogenese mit (Bio)nucleophilen und mechanistische Untersuchungen zur elektrophilen Aminierung, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg.
75. a) D. Wild (1990) A novel pathway to the ultimate mutagens of aromatic amino and nitro compounds, *Environ. Health Perspect.* 88, 27 - 33.
b) D. Wild, A. Dirr (1989) Mutagenic nitrenes/nitrenium ions from azido-imidazoarenes and their structure-activity relationships, *Mutagenesis* 4, 446 - 452.

76. M. Novak, M.J. Kahley, E. Eiger, J.S. Helmick, H.E. Peters (1993) Reactivity and selectivity of nitrenium ions derived from ester derivatives of carcinogenic N-(4-biphenyl)hydroxylamine and the corresponding hydroxamic acid, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 9453 - 9460
77. M.B. Sullivan, K. Brown, C.J. Cramer, D.G. Truhlar (1998) Quantum Chemical Analysis of para-Substitution Effects on the Electronic Structure of Phenylnitrenium Ions in the Gas Phase and Aqueous Solution, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 11778 - 11783.
78. K. El-Bayoumy, E.J. LaVoie, L. Tulley-Freiler, S.S. Hecht (1981) Effects of ortho-methyl substituents on the mutagenicity of aminobiphenyls and aminonaphthalenes, *Mut. Res.* **90**, 345 - 354.
79. M. Nohara, T. Hirayama, Y. Fujioka, S. Ozasa, E. Ibuki, S. Fukui (1985) Relationship between mutagenic potency in *Salmonella typhimurium* and chemical structure of amino- and nitrosubstituted biphenyls, *Mut. Res.* **149**, 9 - 15.
80. S. Yu, D. Herreno-Saenz, D.W. Miller, F.F. Kadlubar, P.P. Fu (1992) Mutagenicity of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons with the nitro substituent situated along the longest molecular axis, *Mut. Res.* **283**, 45 - 52.
81. D. Ren, R.A. McClelland (1998) Carbocation-like reactivity patterns in X'-substituted-4-biphenylnitrenium ions, *Can. J. Chem* **76**, 78 - 84.
82. T. Bube (1995) Stabilisierung von reaktiven ultimalen Carcinogenen des Arylamin-Metabolismus in hydrophoben Bereichen eines wäßrigen Mediums, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg.
83. a) C.A. Mullin, K.A. Rashid, R.O. Mumma (1987) Mutagenic potency of some conjugated nitroaromatic compounds and its relationship to structure, *Mut. Res.* **188**, 267 - 274.
b) K.A. Rashid, C.A. Mullin, R.O. Mumma (1986) Structure-mutagenicity relationships of chalcones and their oxides in the *Salmonella* assay, *Mut. Res.* **169**, 71 - 79.
84. W.A. Vance, D.E. Levin (1984) Structural Features of Nitroaromatics That Determine Mutagenic Activity in *Salmonella typhimurium*, *Environ. Mutagenesis* **6**, 797 - 811.
85. a) P.P. Fu, M.W. Chou, F.A. Beland (1988) Effects of nitro substitution on the in vitro metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons, in: S.K. Yang, B.D. Silverman (Eds.) *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis: Structure-Activity Relationships*, Boca Raton, FL: CRC Press, 37 - 65.
b) P.P. Fu, M.W. Chou, D.W. Miller, G.L. White, R.H. Heflich, F.A. Beland (1985) The orientation of the nitro-substituent predicts the direct acting bacterial mutagenicity of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, *Mut. Res.* **143**, 173 - 181.
c) P.P. Fu, R.H. Heflich, L.S. Von Tungelen, D.T.C. Yang, E.K. Fifer, F.A. Beland (1986) Effect of the nitro group conformation on the rat liver microsomal metabolism and bacterial mutagenicity of 2- and 9-nitroanthracene, *Carcinogenesis* **7**, 1818 - 1927.
d) H. Jung, A.U. Shaikh, R.H. Heflich, P.P. Fu (1991) Nitro Group Orientation, Reduction Potential, and Direct-Acting Mutagenicity of Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Environ. Mol. Mutagen.* **17**, 169 - 180.

86. G. Klopman, D.A. Tonucci, M. Holloway, H.S. Rosenkranz (1984) Relationship between polarographic reduction potential and mutagenicity of nitroarenes, *Mut. Res.* 126, 139 - 145.
87. G.H. Loew, D. Spangler, R.J. Spanggord (1985) Computer-assisted risk assessment: mechanistic structure activity studies on the mutagenic nitroaromatic compounds, in: Tichy, M. (Ed.) *QSAR in Toxicology and Xenobiochemistry*, Elsevier/North Holland Publishing Co., 111 - 126.
88. G.D. McCoy, H.S. Rosenkranz, G. Klopman (1990) Non-mutagenic carcinogens are primarily hydrophobic, *Carcinogenesis* 11, 1111 - 1117.
89. M. Upton, C. Upton (1999) Novel nitrated derivatives of 5,8-diazabenzoc[*c*]phenanthrene and 9,14-diazadibenz[*a,e*]acepheanthrylene: new classes of potent mutagenic compounds, *Mutagenesis* 14, 587 - 593.
90. C. Hansch, A. Leo (1995) *Exploring QSAR, Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, ACS, Washington DC, Chapter 8, 300 - 347.
91. A. Leo (1990) in: C.A. Ramsdon (Ed.) *Comprehensive Medicinal Chemistry, Vol. 4*, Pergamon, 295.
92. J.W. Gorrod, N.N. Bayraktar (1986) The metabolism of 3-aminobiphenyl and 3-acetamidobiphenyl in vitro, *Anticancer Res.* 6, 729 - 731.
93. G.J. Hammons, F.P. Guengerich, C.C. Weis, F.A. Beland, F.F. Kadlubar (1985) Metabolic oxidation of carcinogenic arylamines by rat, dog, and human hepatic microsomes and by purified flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases, *Cancer Res.* 45, 3578 - 3585.
94. C. Ioannides, D.F.V. Lewis, J. Trinick, S. Neville, N.N. Sertkaya, M. Kajbaf, J.W. Gorrod (1989) A rationale for the non-mutagenicity of 2- and 3-aminobiphenyls, *Carcinogenesis* 10, 1403 - 1407.
95. T. Hirayama, T. Watanabe, M. Akita, S. Shimomura, Y. Fujioka, S. Ozasa, S. Fukui (1988) Relationships between structure of nitrated arenes and their mutagenicity in *Salmonella typhimurium*; 2- and 2,7-nitro substituted fluorene, phenanthrene and pyrene, *Mut. Res.* 209, 67 - 74.
96. C. Hansch, A. Leo (1995) *Exploring QSAR, Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, ACS, Washington DC, Chapter 3, 69 - 96.
97. K.T. Chung, L. Kirkovsky, A. Kirkovsky, W.P. Purcell (1997) Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: quantitative structure-activity relationships, *Mut. Res.* 387, 1 - 16.
98. M.E. Colvin, F.T. Hatch, J.S. Felton (1998) Chemical and biological factors affecting mutagen potency, *Mut. Res.* 400, 479 - 492.
99. N.M. Trieff, G.L. Biagi, V.M. Sadagopa Ramanujam, G. Cantelli-Forti, M.C. Guerra, H. Bunce (1989) Aromatic amines and acetamides in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100: a quantitative structure reactivity study, *J. Mol. Toxicol.* 2, 53 - 65.
100. F.T. Hatch, M.E. Colvin (1997) Quantitative structure-activity (QSAR) relationships of mutagenic aromatic and heteroaromatic amines, *Mut. Res.* 376, 87 - 96.

101. G.P. Ford, P.S. Herman (1992) Relative Stabilities of Nitrenium Ions Derived from Polycyclic Aromatic Amines. Relationship to Mutagenicity, *Chem. Biol. Interactions* 81, 1 - 18.
102. G.P. Ford, G.R. Griffin (1992) Relative Stabilities of Nitrenium Ions Derived from Heterocyclic Amine Food Carcinogens: Relationship to Mutagenicity, *Chem. Biol. Interactions* 81, 19 - 33
103. G. Sabbioni, D. Wild (1992) Quantitative structure-activity relationships of mutagenic aromatic and heteroaromatic azides and amines, *Carcinogenesis* 13, 709 - 713.
104. A.K. Debnath, G. Debnath, A.J. Shusterman, C. Hansch (1992) A QSAR Investigation of the Role of Hydrophobicity in Regulating Mutagenicity in the Ames-Test: 1. Mutagenicity of Aromatic and Heteroaromatic Amines in Salmonella typhimurium TA98 and TA100. *Environ. Mol. Mutagen.* 19, 37 - 52.
105. A.K. Debnath, R.L. Lopez de Compadre, A.J. Shusterman, C. Hansch (1992) Quantitative Structure-Activity Relationship Investigation of the Role of Hydrophobicity in Regulating Mutagenicity in the Ames-Test: 2. Mutagenicity of Aromatic and Heteroaromatic Nitro Compounds in Salmonella typhimurium TA100. *Environ. Mol. Mutagen.* 19, 53 - 70.
106. A.K. Debnath, R.L. Lopez de Compadre, G. Debnath, A.J. Shusterman, C. Hansch (1991) Structure-Activity Relationship of Mutagenic Aromatic and Heteroaromatic Nitro Compounds. Correlation with Molecular Orbital energies and Hydrophobicity, *J. Med. Chem.* 34, 786 - 797.
107. A.K. Debnath, C. Hansch (1992) Structure-activity relationship of genotoxic polycyclic aromatic nitro compounds: further evidence for the importance of hydrophobicity and molecular orbital energies in genetic toxicity, *Environ. Mol. Mutagen.* 20, 140 - 144.
108. R.L. Crebelli, L. Conti, A. Carere, R. Zito (1981) Mutagenicity of commercial p-phenylenediamine and of an oxidation mixture of p-phenylenediamine and resorcinol in Salmonella typhimurium TA98, *Food Cosmet. Toxicol.* 19, 79 - 84.
109. G. Kalopissis (1991) Structure-activity relationships of aromatic amines in the Ames Salmonella typhimurium assay, *Mut. Res.* 246, 45 - 66.
110. M. Shimizu, Y. Yasui, N. Matsumoto (1983) Structure specificity of aromatic compounds with special reference to mutagenic activity in Salmonella typhimurium, A series of chloro- or fluoro-nitrobenzene derivatives, *Mut. Res.* 116, 217 - 238.
111. R.L. Lopez de Compadre, A.K. Debnath, A.J. Shusterman C.Hansch (1990) LUMO Energies and Hydrophobicity as Determinants of Mutagenicity by Nitroaromatic Compounds in Salmonella typhimurium, *Environ. Mol. Mutagen.* 15, 44 - 55.
112. R. Braun, G.F. Fuhrmann, W. Legrum, C. Steffen (1999) *Spezielle Toxikologie für Chemiker*, Teubner Verlag, Stuttgart, 188.
113. M.M. Shahin (1987) Relationship between structure and mutagenic activity of environmental chemicals, *Mut. Res.* 181, 243 - 256.
114. G.H. Loew, B.S. Sudindra (1979) Correlation of Calculated Electronic Parameters of Fifteen Aniline Derivatives with their Mutagenic Potencies, *J. Environ. Path. Toxicol.* 2, 1069 - 1078.

115. E.A. Messerly, J.E. Fekete, D.R. Wade, J.E. Sinsheimer (1987) Structure-Mutagenicity Relationships of Benzidine Analogues, *Environ. Mol. Mutagen.* 10, 263 - 274.
116. J.E. Sinsheimer, B.H. Hooberman, S.K. Das, M.D. Brezzell, Z. You (1992) The in vivo and in vitro genotoxicity of aromatic amines in relationship to the genotoxicity of benzidine, *Mut. Res.* 268, 255 - 264.
117. M. Fan, C. Byrd, C.M. Comparde, R.L. Compadre (1998) Comparison of CoMFA models for Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA98+S9, and TA100+S9 mutagenicity of nitroaromatics, *SAR QSAR Environ. Res.* 9, 187 - 215.
118. K. El-Bayoumy, E.J. LaVoie, S.S. Hecht, E.A. Fow, D. Hoffmann (1981) The influence of methyl substitution on the mutagenicity of Nitronaphthalenes and Nitrobiphenyls, *Mut. Res.* 81, 143 - 153.
119. T. Greibrokk, G. Lofroth, L. Nilsson, R. Toftgard, J. Carlstedt-Duke, J.-A. Gustafsson (1985) in: D.E. Rickert (Ed.) *Toxicity of Nitroaromatic compounds*, Hemisphere Publishing Corp., New York, 167 - 187.
120. P.E. Fanta (1974) The Ullmann Synthesis of Biaryls, *Synthesis*, 9 - 21.
121. M. Sainsbury (1980) Modern Methods of Aryl-Aryl Bond Formation, *Tetrahedron* 36, 3327 - 3359.
122. G. Köbrich, P. Buck (1970) Nachweis und Darstellung metallierter Nitroaromaten, *Chem. Ber.* 103, 1412 - 1419.
123. S.P. Stanforth (1998) Catalytic Cross-coupling Reactions in Biaryl Synthesis, *Tetrahedron* 54, 263 - 303.
124. L.S. Hegedus (1994) Palladium in Organic Synthesis, in: M. Schlosser (Ed.), *Organometallics in Synthesis*, Wiley, Chichester, 383 - 459.
125. N. Miyauro, T. Yanagi, A. Suzuki (1981) The Palladium-Catalysed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases, *Synth. Commun.* 11, 513 - 519
126. A. Suzuki, Y. Oh-e, N. Miyauro (1990) Palladium-Catalysed Cross-Coupling Reaction of Aryl or Vinylic Triflates with Organoboron Compounds, *Synlett*, 221 - 223
127. S.-K. Kang, H.-W. Lee, S.-B. Jang, P.-S. Ho (1996) Palladium-Catalysed Cross-Coupling of Organoboron Compounds with Iodonium Salts and Iodanes, *J. Org. Chem.* 61, 4720 - 4724.
128. a) Elektronenarme Chloride: W. Shen (1997) Palladium Catalysed Coupling of Aryl Chlorides with Arylboronic Acids, *Tetrahedron Lett.* 38, 5575 - 5578.
b) Allgemein: A.F. Littke, G.C. Fu (1998) Eine bequeme und allgemein anwendbare Methode für Pd-katalysierte Suzuki-Kreuzkupplungen von Arylchloriden und Arylboronsäuren, *Angew. Chem.* 110, 3586 - 3587.
129. T. Watanabe, N. Miyauro, A. Suzuki (1992) Synthesis of Sterically Hindered Biaryls via the Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Arylboronic Acids or their Esters with Haloarenes, *Synlett*, 207 - 210.
130. K.C. Nicolaou, E.J. Sorensen (1996) *Classics in Total Synthesis*, VCH Weinheim, 589.

131. T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaoura (1995) Palladium(0)-Catalysed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters, *J. Org. Chem.* 60, 7508 - 7510.
132. J.C. Norrild, H. Eggert (1995) Evidence for Mono- and Bidentate Boronate Complexes of Glucose in the Furanose Form. Application of $^1\text{J}_{\text{C-C}}$ Coupling Constants as a Structural Probe, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 1479 - 1484.
133. N. Miyaoura, A. Suzuki (1995) Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds, *Chem. Rev.* 95, 2457 - 2483.
134. J.K. Stille (1986) Palladium-katalysierte Kupplungsreaktionen organischer Elektrophile mit Organozinn-Verbindungen, *Angew. Chem.* 98, 504 - 519.
135. K. Kikukawa, K. Kono, F. Wada, T. Matsuda (1983) Reaction of Diazonium Salts with Transition Metals. 8. Palladium-Catalyzed Carbon-Carbon Coupling of Arenediazonium Salts with Organotin Compounds, *J. Org. Chem.* 48, 1333 - 1336.
136. S.-K. Kang, H.-W. Lee, J.-S. Kim, S.-C. Choi (1996) Palladium Catalysed Cross-Coupling of Organostannanes with Iodanes, *Tetrahedron Lett.* 37, 3723 - 3726.
137. S.G. Schäfer, U. Femfert (1984) Tin - A toxic heavy metal? A Review from the literature, *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 4, 57 - 69.
138. T. Hamasaki, T. Sato, H. Nagase, H. Kito (1992) The genotoxicity of organotin compounds in SOS chromo-test and rec-assay, *Mut. Res.* 280, 195 - 203.
139. H. Neumann, D. Seebach (1978) Brom/Lithium-Austausch an Vinylbromiden mit 2 Moläquivalenten *tert*-Butyllithium. Umsetzungen von Vinylolithiumverbindungen mit Hetero- und Kohlenstoff-Elektrophilen, *Chem. Ber.* 111, 2785 - 2812.
140. G.B. Smith, G.C. Dezeny, D.L. Hughes, A.O. King, T.R. Verhoeven (1994) Mechanistic Studies of the Suzuki Cross-Coupling Reaction, *J. Org. Chem.* 59, 8151 - 8156.
141. H. Stetter, M. Schwarz, A. Hirschhorn (1959) Monofunktionelle Adamantan-Derivate, *Chem. Ber.* 92, 1629 - 1635.
142. P.B.D. De la Mare (1959) *Aromatic substitution; nitration and halogenation*, Academic Press, New York, 109.
143. S. Murphy, X. Yang, G.B. Schuster (1995) Cyanine Borate Salts that Form Penetrated Ion Pairs in Benzene Solution: Synthesis, Properties, and Structure, *J. Org. Chem.* 60, 2411-2422.
144. R. Brückner (1996) *Reaktionsmechanismen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 157 - 158.
145. M.H. Abraham, P.L. Grellier (1985) in: F.R. Hartley, S. Patai (Eds) *The Chemistry of the Metal-Carbon Bond, Vol. I*, Wiley, New York, 115.
146. G.E. Carr, R.D. Chambers, T.F. Holmes (1987) Polyfluoroaryl Organometallic Compounds XVII. 2,4,6-Tris(trifluoromethyl)phenyllithium, a sterically crowded system. *J. Organomet. Chem.* 325, 13 -23.)
147. T. Hayashi, K. Hayashizaki, T. Kiyoi, Y. Ito (1988) Asymmetric Synthesis Catalysed by Chiral Ferrocenylphosphine-Transition-Metal Complexes. 6. Practical Asymmetric Synthesis of 1,1'-Binaphthyls via Asymmetric Cross-Coupling with a Chiral [(alkoxyalkyl)ferrocenyl]monophosphine/Nickel Catalyst, *J. Am. Chem. Soc.* 110, 8153 - 8156.

148. M. Smith (1994) *Organic Syntheses*, McGraw-Hill, 192.
149. L. Gattermann, H. Wieland (1982) *Die Praxis des organischen Chemikers*, Walter de Gruyter & Co. Berlin, New York, 539 - 540.
150. Organikum, 16 Auflage (1986) *Oxidation und Dehydrierung*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 402 - 408.
151. C. Glende (1998) Mutagenitätsuntersuchungen an alkylierten 4-Aminobiphenylen, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg.
152. T. Haack (1999) Mutagenitätstests und DNA-Adduktanalysen an alkylierten 4-Amino-, 4-Hydroxylamino- und 4-Nitrosobiphenylen, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg.
153. G.W. Kabalka (1990) Reduction of Nitro and Nitroso Compounds, in: B.M. Trost, I. Fleming (Eds.) *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 8., Pergamon Press, 363 - 379.
154. C. Amatore, A. Jutand, S. Negri (1990) Efficient palladium-catalyzed synthesis of unsymmetrical donor-acceptor biaryls and polyaryls, *J. Organomet. Chem.* 390, 389 - 398.
155. V. Farina, B. Krishnan (1991) Large Rate Acceleration in the Stille Reaction with Tri-2-furylphosphine and Trifurylarsine as Palladium Ligands: Mechanistic and Synthetic Implications, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 9585 - 9595.
156. U. Kraatz (1973) Notiz zur Synthese von 1-Adamantyläthern, *Chem. Ber.* 106, 3095 - 3096.
157. Für eine Übersicht über Brückenkopf-Carbeniumionen siehe: R.C. Jr Fort (1973) in: G.A. Olah, P.v.R. Schleyer (Eds.) *Carbenium Ions*, Vol. 4, Wiley-Interscience, New York, Kapitel 32.
158. Organikum, 16 Auflage (1986) Ester durch Alkoholyse von Carbonsäuren und Carbonsäurederivaten, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 402 - 408.
159. L.C. Raiford, J.C. Colbert (1925) 3-Nitro-4-Hydroxydiphenyl and some of its Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 47, 1454 - 1458.
160. R.J. Gage, J.M. Wagner (1995) A Convenient Method for Direct N-tert-Butylation of Aromatic Amines, *J. Org. Chem.* 60, 2613 - 2614.
161. T.M. Leslie, R.N. Demartino, E.W. Choe, G. Khanarian, D. Haas, G. Nelson, J.B. Stamatoff, D.E. Stuetz, C. Teng, H.-N. Yoon. (1987) Development of Polymeric Nonlinear Optical Materials, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 153, 451 - 477.
162. H.K. Porter (1973) The Zinin Reduction of Nitroarenes, *Org. React.* 20, 455 - 481.
163. N. Krause (1996) *Metallorganische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 195.
164. US Patent 2150832.
165. A. Zander (1882) Über die spezifischen Volumina einiger Allyl-, Propyl und verwandter Verbindungen, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 214, 138 - 193.
166. W.D. Weringa, M.J. Janssen (1968) Substituent Effects of Pyrrolidino and Piperidino Groups in Benzoic Acids and Nitrobenzenes, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 87, 1372 - 1380.
167. H. Hoffmann (1925) IX. Über das Biphenyl, *Chem. Ber.* 58, 1909 - 1913.

168. L. Brandsma, S.F. Vasilevsky, H.D. Verkruijsse (1998) *Application of transition metal catalysts in organic synthesis*, Springer Verlag, Berlin, 138.
169. E. Sawicki (1954) 7-Alkyl Derivatives of 2-Aminofluorene, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 2269 - 2271.
170. M. Bruch, M. Große, D. Rewicki (1976) *tert*-Butylierung von Fluoren, *Liebigs. Ann. Chem.*, 74 - 88.
171. J.F. Cairns, W.J. Hickinbottom (1962) Alkylation of the Aromatic Nucleus. Part VI. Fluorene, *J. Chem. Soc.*, 867 - 870.
172. K. Tamao, K. Sumitani, Y. Kiso, M. Zembayashi, A. Fujioka, S. Kodama, I. Nakajima, A. Minato, M. Kumada (1976) Nickel-Phosphine Complex-Catalyzed Grignard Coupling. I. Cross-coupling of Alkyl, Aryl, and Alkenyl Grignard Reagents with Aryl and Alkenyl Halides: General Scope and Limitations, *Bull. Chem. Soc. Jp.* 49, 1958 - 1969.
173. a) K. Tamao, Y. Kiso, K. Sumitani, M. Kumada (1972) Alkyl Group Isomerisation in the Cross-Coupling Reaction of Secondary Alkyl Grignard Reagents with Organic Halides in the Presence of Nickel-Phosphine Complexes as Catalysts, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 9268 - 9269.
b) K. Tamao, K. Sumitani, M. Kumada (1972) Selective Carbon-Carbon Bond Formation by Cross-Coupling of Grignard Reagents with Organic Halides. Catalysis by Nickel-Phosphine Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4374 - 4376.
174. K. Tamao, N. Ishida, M. Kumada (1983) (Di-*iso*-propoxymethylsilyl)methyl Grignard Reagents. A New, Practically Useful Nucleophilic Hydroxymethylating Agent, *J. Org. Chem.* 48, 2120 - 2122.
175. M. Sato, N. Miyaara, A. Suzuki (1989) Cross-Coupling of Alkyl- or Arylboronic Acid Esters with Organic Halides Induced by Thallium(I) Salts and Palladium-Catalyst, *Chem. Lett.*, 1405 - 1408.
176. M. Ohno, K. Shimizu, K. Ishizaki, T. Sasaki, S. Egucchi (1988) Cross-Coupling Reaction of *tert*-Alkyl Halides with Grignard Reagents in Dichloromethane as a Non-Lewis Basic Medium, *J. Org. Chem.* 53, 729 - 733.
177. D. Milstein, J.K. Stille (1979) Palladium-Catalysed coupling of Tetraorganotin Compounds with Aryl and Benzyl Halides. Synthetic Utility and Mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* 101, 4992 - 4998.
178. M.-C. Viaud, P. Jamoneau, L. Savelon, G. Guillaumet (1996) Substituted oxazolo[4,5-b]pyridin-2(3H)-ones: Functionalization at 6-position, *Tetrahedron Lett.* 37, 2409 - 2412.
179. G. Nordvall, S. Sundquist, G. Johansson, G. Glas, L. Nilvebrant, U. Hacksell (1996) 3-(2-Benzofuranyl)quinuclidin-2-ene derivatives: novel muscarinic antagonists, *J. Med. Chem.* 39, 3269 - 3277.
180. T. Iihama, J.-M. Fu., M. Bouguignon, V. Sniekus (1989) Regiospecific Syntheses of All Isomeric Nitrofluorenones and Nitrofluorenes by Transition Metal Catalyzed Cross-Coupling Reactions, *Synthesis*, 184 - 188.
181. M. Rottländer, N. Palmer, P. Knochel (1996) Selective Pd(0)-Catalyzed Arylations with New Electrophilic or Nucleophilic Multi-Coupling Reagents, *Synlett*, 573 - 575.

182. A.L. Casalnuovo, J.C. Calabrese (1990) Palladium-Catalyzed Alkylations in Aqueous Media, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4324 - 4330.
183. K. Soai, A. Ookawa (1986) Mixed Solvents Containing Methanol as Useful Reaction Media for Unique Chemoselective Reductions with Lithium Borohydride, *J. Org. Chem.* 51, 4000 - 4005.
184. P.E. Eaton, G.R. Carlson, J.T. Lee (1973) Phosphorus Pentoxide Methanesulfonic Acid. A Convenient Alternative to Polyphosphoric Acid, *J. Org. Chem.* 88, 4071 - 4073.
185. US Patent 3849429.
186. a) W.S. Jr. Wadsworth (1977) Synthetic Applications of Phosphoryl Stabilized Anions, *Org. React.* 25, 73 - 253.
b) H. Gross, I. Keitel (1982) Heterosubstituierte Olefine durch Horner-Reaktion mit α -substituierten Phosphonaten, *Z. Chem.* 22, 117 - 126.
187. M. Schlosser, K.-F. Christmann (1967) Mechanismus und Stereochemie der Wittig-Reaktion, *Liebigs Ann. Chem.* 708, 1 - 35.
188. J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki, B.N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 5135 - 5139.
189. E.J. LaVoie, G. Briggs, V. Bedenko, D. Hoffmann (1982) Mutagenicity of substituted carbazoles in Salmonella typhimurium, *Mut. Res.* 101, 141 - 150.
190. J. Ashby, D. Paton, P.A. Lefevre, J.A. Styles, F.L. Rose (1982) Evaluation of two suggested methods of Deactivating organic carcinogens by molecular modification, *Carcinogenesis* 3, 1277 - 1282.
191. V.R. Kolland, B.C. Saunders, F.L. Rose, A.L. Walpole (1974) Safer Substitute for Benzidine in the Detection of Blood, *Tetrahedron* 30, 3299 - 3302.
192. J. Ashby, D. Paton, P.A. Lefevre (1982) Cyclic Amines as Less Mutagenic Replacements for Dimethyl Amino Substituents on Aromatic Organic Compounds: Implications for Carcinogenicity and Toxicity, *Cancer Lett.* 17, 263 - 271.
193. C. Willeke (1998) Untersuchungen an Nitreniumionen und ihre Reaktion mit Übergangsmetallen - Mutagenitätsuntersuchungen an aromatischen Aminen, *Dissertation*, Cuvillier Verlag Göttingen, 116 - 137.
194. H.A. Masson, C. Ioannides, J.W. Gorrod, G.G. Gibson (1983) The role of highly purified cytochrome P-450 isozymes in the activation of 4-aminobiphenyl to mutagenic products in the Ames test, *Carcinogenesis* 4, 1583 - 1586.
195. W.A. Vance, Y.Y. Wang, H.S. Okamoto (1987) Disubstituted Amino-, Nitroso-, and Nitrofluorenes: A Physicochemical Basis For Structure-Activity Relationships in Salmonella typhimurium, *Environ. Mutagen.* 9, 123 - 141.
196. N. Abmann, M. Emmrich, G. Kampf, M. Kaiser (1997) Genotoxic activity of important nitrobenzenes and nitroanilines in the Ames test and their structure-activity relationship, *Mut. Res.* 395, 139 - 144.
197. M. Shimizu, E. Yano (1985) Mutagenicity of mono-nitrobenzene derivatives in the Ames test and rec assay, *Mut. Res.* 170, 11 - 22.

198. F.A. Beland, W.B. Melchior Jr., L.L.G. Mourato, M.A. Santos, M.M. Marques (1997) Arylamine-DNA adduct formation in relation to mutagenesis, *Mut. Res.* 376, 13 - 19.
199. C. Hansch, A. Leo (1995) *Exploring QSAR, Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, ACS, Washington DC, Chapter 8, 304.
200. A.J. Sherratt, L.A. Damani (1985) The Metabolism of N,N-Dimethylaniline by Rat Hepatocytes, in: J.W. Gorrod, L.A. Damani (Eds.) *Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules*, VCH, Weinheim, 101 - 106.
201. N.J. Gooderham, J.W. Gorrod (1985) Microsomal N-Oxidation of Secondary Aromatic Amines, in: J.W. Gorrod, L.A. Damani (Eds.) *Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules*, VCH, Weinheim, 81 - 95.
202. J.J. Kamm, A. Szuna. (1973) Studies on an unusual N-dealkylation reaction. II. Characteristics of the enzyme system and a proposed pathway for the reaction, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 184, 729 - 738.
203. S.S. Hecht, K. El-Bayoumy, L. Tulley, E. LaVoie (1979) Structure-Mutagenicity Relationships of N-Oxidized Derivatives of Aniline, o-Toluidine, 2'-Methyl-4-aminobiphenyl, and 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl, *J. Med. Chem.* 22, 981 - 987.
204. M.M. Shahin, A. Bugaut, G. Kalopissis (1980) Structure-activity relationship with a series of m-diaminobenzene derivatives, *Mut. Res.* 78, 25 - 31.
205. T.K. Rao, G.F. Dorsey, B.E. Allen, J.L. Epler (1982) Mutagenicity of 4,4'-methylenedianilin derivatives in the Salmonella histidine reversion assay, *Arch. Toxicol.* 49, 185 - 190.
206. H. Schmitt (1997) Der Einfluß von ortho-Alkylsubstituenten auf die Mutagenität von aromatischen Aminen, *Dissertation*, Cuvillier Verlag Göttingen.
207. U. Voigtmann (1996) Mutagenitätsuntersuchungen an ortho-alkylierten 4-Nitrobiphenylen, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg.
208. J.S. Felton, persönliche Mitteilung.
209. M. Numann, H. Schenk, D. Döpp (1995) Structure of 1,3,5-tri-*iso*-propyl-2-nitrobenzene, *Acta Crystallogr. Sect. C* 51, 260 - 266.
210. J.A. DeRidder, H. Schenk, D. Döpp (1993) 1,5-Di-*tert*-butyl-2,4-dinitrobenzene, *Acta Crystallogr. Sect. C* 49, 1970 - 1974.
211. US Patent 5676708.
212. T. Sugimura, S. Sato (1983) Bacterial mutagenicity of natural products, pyrolysis products and additives in foodstuffs and their association with genotoxic effects in mammals, in: A.W. Hayes, R.C. Schnell, T.S. Miya (Eds.) *Developments in the Science and Practice of Toxicology*, Elsevier, Amsterdam, 115 -133.
213. a) D.W. Later, R.A. Pelroy, D.L. Stewart, T. McFall, G.M. Booth, M. Tedjamulia, R.N. Castle (1984) Microbial mutagenicity of isomeric two-, three-, and four-ring amino polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environ. Mutagen.* 6, 497 - 515.
b) J.D. Scribner, S.R. Fisk, N.K. Scribner (1979) Mechanisms of action of carcinogenic aromatic amines: An investigation using mutagenesis in bacteria, *Chem.-Biol. Interact.* 26, 11 -25.

214. V.F. Simmon (1979) In vitro mutagenicity assays of chemical carcinogens and related compounds with *Salmonella typhimurium*, *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 893 - 899.
215. R. Braun, G.F. Fuhrmann, W. Legrum, C. Steffen (1999) *Spezielle Toxikologie für Chemiker*, Teubner Verlag, Stuttgart, 174.
216. K. Tatsumi, S. Kitamura, H. Yoshimura (1978) Susceptibility of aromatic nitro compounds to xanthine oxidase-catalyzed reduction, *Chem. Pharm. Bull.* 26, 1713 - 1717.
217. B.P. Cho, F.A. Beland, M.M. Marques (1992) NMR structural studies of a 15-mer DNA sequence from a ras protooncogene, modified at the first base of codon 61 with the carcinogen 4-aminobiphenyl, *Biochemistry* 31, 9587 - 9602.
218. L.M. Eckel, T.R. Krugh (1994) Structural Characterisation of two Interchangeable Conformations of a 2-Aminofluorene-Modified DNA Oligomer by NMR and Energy Minimization, *Biochemistry* 33, 13611 - 13624.
219. R. Shapiro, B. E. Hingerty, S. Broyde (1989) Minor-Groove Binding Models for Acetylaminofluorene Modified DNA, *J. Biomol. Struc. Dyn.* 7, 493 - 513.
220. S.F. O'Handley, D.G. Sanford, R. Xu, C.C. Lester, B. Hingerty, S. Broyde, T.R. Krugh (1993) Structural Characterisation of an N-Acetyl-2-aminofluorene (AAF) Modified DNA Oligomer by NMR, Energy Minimization, and Molecular Dynamics, *Biochemistry* 32, 2481 - 2497.
221. S.J. Nolan, R.R. Vyas, B.E. Hingerty, S. Ellis, S. Broyde, R. Shapiro, A.K. Basu (1996) Solution properties and computational analysis of an oligodeoxynucleotide containing N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene, *Carcinogenesis* 17, 133 - 144.
222. L. Zhou, M. Rajabzadeh, D.D. Traficante, B.P. Cho (1997) Conformational Heterogeneity of Arylamine-Modified DNA: 19F NMR Evidence, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5384 - 5389.
223. a) J.E. Rice, A. Rivenson, J. Braley, E.J. LaVoie (1987) Methylated Derivatives of Pyrene and Fluorene: Evaluation of Genotoxicity in the Hepatocyte/DNA Repair Test and Tumorigenic Activity in Newborn Mice, *J. Tox. Environ. Health* 21, 525 - 532.
b) E.J. LaVoie, L. Tulley, V. Bedenko, Z. Girach, D. Hoffmann (1981) Mutagenicity of methylated fluorenes and benzofluorenes, *Mut. Res.* 91, 167 - 176.
c) J.E. Rice, N.G. Geddie, M.C. DeFloria, E.J. LaVoie (1988) Structure requirements favoring mutagenicity among methylated pyrenes in *S. typhimurium*, in: M.C. Cooke, A.J. Dennis (Eds.) *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Decade of progress*, Columbus, 773 - 785.
224. E. Boyland, P. Sims (1965) Metabolism of polycyclic compounds: the metabolism of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by rat liver homogenates, *Biochem. J.* 95, 780 - 787.
225. J.W. Flesher, K.L. Sydor (1973) Possible role of 6-hydroxymethylbenzo[a]pyrene as a proximate carcinogen of benzo[a]pyrene and monomethylbenzo[a]pyrene, *Int. J. Cancer* 11, 433 - 437.
226. H. Glatt, G. Werle-Schneider, N. Enders, S. Monnerjahn, J. Pudil, A. Czich, A. Seidel, M. Schwarz (1994) 1-Hydroxymethylpyrene and its sulfuric acid ester: toxicological effects in vitro and in vivo, and metabolic aspects, *Chem.-Biol. Interact.* 92, 305 - 319.
227. Y.-S. Surh, A. Liem, E.C. Miller, J.A. Miller (1990) The strong hepatocarcinogenicity of the electrophilic and mutagenic metabolite 6-sulfooxymethylbenzo[a]pyrene and its

- formation of benzylic DNA adducts in the livers of infant male B6C3F1 mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 85 - 91.
228. H. Glatt, R. Henschler, H. Frank, A. Seidel, C. Yang, E. Abu-Shqara, R.G. Harvey (1993) Sulfotransferase-mediated mutagenicity of 1-hydroxymethylpyrene and 4H-cyclopenta[def]chrysen-4-ol and its enhancement by chloride anions, *Carcinogenesis* 14, 599 - 602.
229. H. Glatt, R. Henschler, D.H. Phillips, J.W. Blake, P. Steinberg, A. Seidel, F. Oesch (1990) Sulfotransferase-Mediated Chlorination of 1-Hydroxymethylpyrene to a Mutagen Capable of Penetrating Indicator Cells, *Environ. Health Perspec.* 88, 43 - 48.
230. T.R. Juneja, A. Bala, P. Kumar, R.L. Gupta (1995) Mutagenicity of nitrobenzyl derivatives: potential bioreductive anticancer agents, *Mut. Res.* 348, 137 - 145.
231. A. Dipple, P.D. Lawley, P. Brookes (1968) Theory of tumor initiation by chemical carcinogens: dependence of activity on structure of ultimate carcinogens, *Eur. J. Cancer* 4, 493 - 506.
232. S.C. Booth, A.J. Mould, A. Shaw, R.C. Garner (1983) The biological activity of 4-chloromethylbiphenyl, benzyl chloride and 4-hydroxymethylbiphenyl in 4 short-term tests for carcinogenicity. A report of an individual study in the UKEMS genotoxicity trial 1981, *Mut. Res.* 119, 121 - 133.
233. G. Koss (1994) Kohlenwasserstoffe, in: H. Marquardt, S.G. Schäfer (Hrsg.) *Lehrbuch der Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 369 - 404.
234. Z. You, M.D. Brezzell, S.K. Das, M.C. Espadas-Torre, B.H. Hooberman, J.E. Sinsheimer (1993) Ortho-substituent effects on the in vitro and in vivo genotoxicity of ben-zidine derivatives, *Mut. Res.* 319, 19 - 30.
235. Z. You, M.D. Brezzell, S.K. Das, B.H. Hooberman, J.E. Sinsheimer (1994) Substituent effects on the in vitro and in vivo genotoxicity of 4-aminobiphenyl and 4-aminostilbene derivatives, *Mut. Res.* 320, 45 - 58.
236. B.H. Hooberman, M.D. Brezzell, S.K. Das, Z. You, J.E. Sinsheimer (1994) Substituent effects on the genotoxicity of 4-nitrostilbene derivatives, *Mut. Res.* 341, 57 - 69.
237. M.J.S. Dewar, E.G. Zebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart (1985) AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model, *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3902-3909.
238. H. Gilman, A.H. Hauben (1944) The Quantitative Analysis of Alkylolithium Compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 66, 1515-1516.
239. W.C. Still, M. Kahn, A. Mitra (1978) Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution, *J. Org. Chem.* 43, 2923 - 2925.
240. M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh (1991) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
241. W.S.N. Grieve, D.H. Hey (1932) Substitution in Compounds containing Two or More Phenyl Groups. Part I. The Nitration of 4-Methyldiphenyl. *J. Chem. Soc.*, 1888-1894.
242. K. Shudo, T. Ohta, T. Okamoto (1981) Acid-Catalyzed Reactions of N-Arylhydroxylamines and Related Compounds with Benzene. Iminium-Benzenium Ions, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 645-653.

243. E. Negishi, T. Takahashi, A.O. King (1987) Synthesis of Biaryls via Palladium-Catalysed Cross Coupling: 2-Methyl-4'-nitrobiphenyl, *Org. Synth.* 66, 67 - 74.
244. M.R. Pettit, J.C. Tatlow (1951) Synthesis of Certain Trifluorodiphenyl Derivatives, *J. Chem. Soc.*, 3459 - 3464.
245. F.D. Bellamy, K. Ou (1984) Selective Reduction of Aromatic Nitro Compounds with Stannous Chloride in Non Acidic And Non Aqueous Medium, *Tetrahedron Lett.* 25, 839 - 842.
246. D.S. Tarbell, Price, J.A. (1957) Use of Mixed Carbocyclic-Carbonic Anhydrides for Acylations on Carbon and Oxygen, *J. Org. Chem.* 22, 245 - 250.
247. B. Jones, F. Chapman (1952) The Nitration of Esters of 4-Hydroxydiphenyl. The Preparation of 4-Hydroxy-4'- and -2'-nitrodiphenyls. *J. Chem. Soc.*, 1829 - 1832.
248. M. Klein (1997) Mutagenitätsuntersuchungen an substituierten Nitrobiphenylen, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg.
249. A.M. Echavarren, J.K. Stille (1987) Palladium-Catalyzed Coupling of Aryl Triflates with Organostannanes, *J. Am. Chem. Soc.* 109, 5478 - 5486.
250. B. Sleight, J.P. Jones (1954) The Halogenation of Phenolic Ethers and Anilides. Part XVI. Kinetics of the Chlorination of Diphenyl and Naphthyl Ethers, *J. Chem. Soc.*, 1775 - 1780.
251. C.F.H. Allen, J.W. Gates (1955) *ortho-n*-Butoxynitrobenzol, *Org. Synth. Coll.*, Vol. 3, 140 - 141.
252. H. Masada, Y. Oishi (1978) A new Synthesis of Aryl *t*-Butyl Ethers, *Chem. Lett.*, 57 - 58.
253. H.R. Rogers, J. Houk (1982) Preliminary Studies of the Mechanism of Metal-Halogen Exchange. The Kinetics of Reaction of *n*-Butyllithium with Substituted Bromobenzenes in Hexane solution, *J. Am. Chem. Soc.* 104, 522 - 525.
254. Organikum, 16 Auflage (1986) Synthese von Ethern aus Alkoholaten bzw. Phenolaten, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 196 - 199.
255. M. Hird, A.J. Seed, K.J. Toyne, J.W. Goodby, G.W. Gray, D.G. McDonnell (1993) Synthesis, Transition Temperatures and Optical Anisotropy of some Isothiocyanato-substituted Biphenyls, *J. Mater. Chem.* 3, 851 - 859.
256. S.S. Novikov, A.P. Khadin, I.A. Novakov, S.S. Radchenko (1977) Synthesis of Adamantyl Aryl Ethers, *J. Org. Chem. USSR (Eng. Translation)* 13, 613.
257. V. Caló, F. Ciminale, L. Lopez, P.E. Todesco (1971) A Selective Bromination of Aromatic Amines, *J. Chem. Soc. (C)*, 3652 - 3653.
258. G.W. Gray, M. Hird, D. Lacey, K. Toyne (1989)) The Synthesis and Transition Temperatures of Some 4,4"-Dialkyl- and 4,4"-Alkoxyalkyl-1,1':4',1"-terpenyls with 2,3- or 2',3'-Difluoro Substituents and of their Biphenyl Analogues, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2041 - 2054.
259. J. Berthelot, C. Guette, M. Essayegh, P.L. Desbene, J.J. Basselier (1986) Regioselective Monobromination of Aromatic Amines with Tetrabutylammonium Tribromide, *Synth. Commun.* 16, 1641 - 1645.

260. S. Kajigaeshi, T. Kakinami, T. Okamoto, S. Fujisaki (1987) Synthesis of Bromoacetyl Derivatives By Use of Tetrabutylammonium Tribromide, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 60, 1159 - 1160.
261. K.S. Dhimi, J.B. Stothers (1966) ^{13}C N.M.R. Studies, *Can. J. Chem.* 44, 2855 - 2866.
262. F. Ullmann, J. Bielecki (1901) Über Synthesen in der Biphenylreihe, *Chem. Ber.* 34, 2174 - 2185.
263. J.A. Cade, A. Pilbeam (1964) Aspects of Polyphenyl Chemistry. Part II. Synthesis of Sexiphenyls, *J. Chem. Soc.*, 114 -121.
264. T. Kauffmann, H. Fischer, R. Nürnberg, R. Wirthwein (1970) Über die Selektivität hetero- und carbocyclischer Arine gegenüber Basen, *Liebigs Ann. Chem.* 731, 23 - 36.
265. P.P. Wickham, K.H. Hazen, H. Guo, G. Jones, K. Hardee Reuter, W.J. Scott (1991) Benzyne Generation from Aryl Triflates, *J. Org. Chem.* 56, 2045 - 2050.
266. H. Stetter, J. Weber, C. Wulff (1964) Herstellung von Derivaten des 1-Phenyl-adamantans, *Chem. Ber.* 97, 3488 - 3492.
267. Y. Tohda, M. Eiraku, T. Nakagawa, Y. Usami, M. Ariga, T. Kawashima, K. Tani, H. Watanabe, Y. Mori (1990) Nucleophilic Reaction upon Electron-Deficient Pyridone Derivatives. One-Pot Synthesis of 3-Nitropyridines by Ring Transformation of 1-Methyl-3,5-dinitro-2-pyridone with Ketones or Aldehydes in the Presence of Ammonia, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 63, 2820 - 2827.
268. T.A. Kelly, D.W. McNeil (1994) A Simple Method for the Protection of Aryl Amines as their t-Butylcarbamoyle (Boc) Derivatives, *Tetrahedron Lett.* 35, 9003 - 9006.
269. H.J. Den Hertog, C. Jouwersma, A.A. Van der Wal, E.C.C. Willebrands-Schogt (1949) Synthesis of 2-Amino-5-ethoxypyridine, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 68, 275 - 285.
270. N.A. Bumagin, V.V. Bykov (1996) Reaction of Organoboron Compounds with Organic Halides in Aqueous Media, Catalyzed by "Ligand-Free" Palladium, *Russ. J. Gen. Chem.* 66, 1925 - 1938.
271. H.-J. Deussen, E. Hendrickx, C. Boutton, D. Krog, K. Clays, K. Bechgaard, A. Persoons, T. Bjørnholm (1996) Novel Chiral Bis-dipolar 6,6'-Disubstituted Binaphthol Derivatives for Second-Order Nonlinear Optics: Synthesis and Linear and Nonlinear Optical Properties, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6841 - 6852.
272. P.E. Hanna, R.E. Gammans, R.D. Schon, M.-K. Lee (1980) Metabolic N-Hydroxylation. Use of Substituent Variation to Modulate the in Vitro Bioactivation of 4-Acetamidostilbenes, *J. Med. Chem.* 23, 1038 - 1044.
273. B. Ludolph (1999) Mutagenitätsuntersuchungen an alkylierten Dimethylaminoazobenzenen, 4-Aminostilbenen und 4-(Phenylethynyl)anilinen. *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg.